Die Wirkung von Methotrexat auf das Fibrosarkum und das Adenokarzinom der weiblichen C3H-Maus

Heinrich Gruber

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547022_0023

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der Universität München
Vorstand: N.N.

Die Wirkung von Methotrexat auf das Fibrosarkom und das Adenokarzinom der weiblichen C3H-Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Heinrich Gruber
aus
Dorfbach
1981

Mit Genehmigung der Fachbereiche Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K.R. Trott
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Willmanns
Dekan: Prof. Dr. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 10. März 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MEINER MUTTER GEWIDMET

Für die freundliche Unterstützung bei der Planung der Versuche und der Auswertung der Arbeit danke ich an dieser Stelle vor allem Herrn Prof. Dr. K.H. Trott, Herrn Dr. J. Kummermehr und Frau Dr. H. Eichholz.

Die Versuche habe ich zusammen mit meinem Kommilitonen J. Ruf durchgeführt. Ihm gilt für die hervorragende Zusammenarbeit mein besonderer Dank.

An dieser Stelle spreche ich auch den Assistentinnen des Strahlenbiologischen Instituts für die Hilfe bei der Durchführung der praktischen Arbeiten meinen Dank aus.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODE	3
1.	Versuchstiere	3
2.	Tumoren	3
3.	Transplantation	3
4.	Messung der Tumorgröße bzw. des Tumorgewichts	5
5.	Cytostatikum	6
6.	Leucovorin	6
7.	Knochenmarkstransplantation	7
8.	Versuchsdurchführung und -auswertung	7
III.	ERGEBNISSE	10
1.	Zusammenfassung der Ergebnisse	10
2.	Einzeitbehandlung	12
3.	Fraktionierung (3x), Behandlungsintervall 1 h und 6 h, Dosis bleibt jeweils gleich	18
4.	Fraktionierung (3x und 5x), Behandlungsintervall 3 h und 12 h, Dosis bleibt jeweils gleich	21
5.	Fraktionierung (5x), Behandlungsintervall 3 h, Knochenmarkstransplantation, Veränderung der Dosis	22
6.	Fraktionierung von 1x bis 5x, Behandlungsintervall 24 h dazu Leucovorin	27
IV.	DISKUSSION	32
1.	Wirkungsweise von Methotrexat	32
2.	Pharmakokinetik von Methotrexat	38
3.	Diskussion der Ergebnisse	40
4.	Experimente mit Methotrexat auf Mäusetumoren aus der Literatur - Vergleich mit eigenen Ergebnissen	44
V.	ZUSAMMENFASSUNG	47
	LITERATURVERZEICHNIS	48
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	50
	LEBENSLAUF	51

I. EINLEITUNG

Methotrexat hat in den 60er Jahren in der Krebsbehandlung zunehmend andere Antimetaboliten wie Aminopterin wegen seiner besseren therapeutischen Ergebnisse aus der Klinik verdrängt (1). Den größten Nutzen aus der Therapie mit Methotrexat ziehen rasch proliferierende Tumore, was aus seiner Wirkungsweise abzuleiten ist (1, 5, 10, 14). Da die Proliferationsrate in den menschlichen Tumoren nur wenig höher oder gar niedriger ist als die der meisten kritischen normalen Gewebe wie Gastrointestinalmucosa, Knochenmark und Haut (15) und Methotrexat keine selektive Wirkung auf Tumorgewebe hat, ist der therapeutische Bereich dieses Cytostatikums eingeengt (1). Parallel zu den hier beschriebenen Untersuchungen an Tumoren wurden auch Toxizitätsuntersuchungen durchgeführt, die von J. Ruf in seiner Dissertation (17) beschrieben wurden. Zum Schutz des gesunden Gewebes wird das Agens meist in Verbindung mit Leucovorin verabreicht. Wegen seiner begrenzten Antitumorwirkung müssen häufig zusätzlich andere Therapeutika hinzugezogen werden wie Bestrahlung und die Kombination mit anderen Zytostatika.

Zwei allerdings seltene menschliche Tumorarten können durch Monotherapie mit Methotrexat geheilt werden. Das Choriokarzinom, ein fötaler Tumor mit 50 - 60% Heilungsrate und das Burkitt - Lymphom. Hierfür spielt aber nach Meinung vieler Autoren die starke Immunreaktion des Tumorträgers eine erhebliche Rolle (1).

Einer der bedeutendsten Anwendungsbereiche für Methotrexat ist die akute lymphatische Leukämie beim Kind. Gegen Brustkrebs hat es sich als ein sehr effektives Mittel erwiesen. Neben der weniger erfolgreichen Anwendung gegen verschiedene andere, vor allem solide Tumoren, wird es auch bei nicht neoplastischen Krankheiten wie bei der generalisierten Psoriasis und als immunosuppressives Mittel

eingesetzt. Um eine optimale Wirkung erzielen zu können, muß der Therapiemodus auf jede einzelne Tumorart abgestimmt sein (1).

Zweck dieser Arbeit ist es, Methotrexat an zwei isogenen transplantablen Mäusetumoren, dem Fibrosarkom SSK 31 und dem Adenokarzinom 284 der C3H-Maus zu erproben. Dabei interessiert besonders die Frage, ob und inwieweit der Therapieerfolg von der zeitlichen Dosisverteilung abhängt und welche Rolle dabei das Proliferationsmuster der Tumoren spielt.

II. MATERIAL UND METHODE

1. Versuchstiere

Die Versuche wurden an ingezüchteten weiblichen C3H-Mäusen durchgeführt, die in den Tierställen der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in Neuherberg gezüchtet wurden. Die Mäuse waren am Tag der Transplantation zwischen 7 - 10 Wochen alt und hatten ein Gewicht von etwa 20g. Sie wurden im offenen Stall des Physiologischen Instituts mit Trockenfutter und Wasser ad libitum gehalten. Nach etwa einer Woche Adaptation wurde mit den Versuchen begonnen.

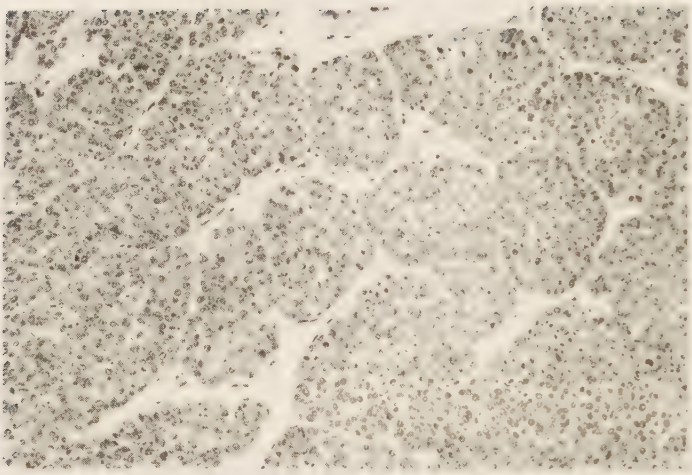
2. Tumoren

Für die Versuche wurden zwei isogene Tumortypen, das Fibrosarkom und das Adenokarzinom verwendet, die innerhalb des C3H-Stammes regelmäßig transplantiert wurden. Das Adenokarzinom ist spontan entstanden, während das Fibrosarkom durch Methylcholanthren induziert worden war. Beide Tumoren sind nicht immunogen.

- Histologie

  a) Adenokarzinom 284

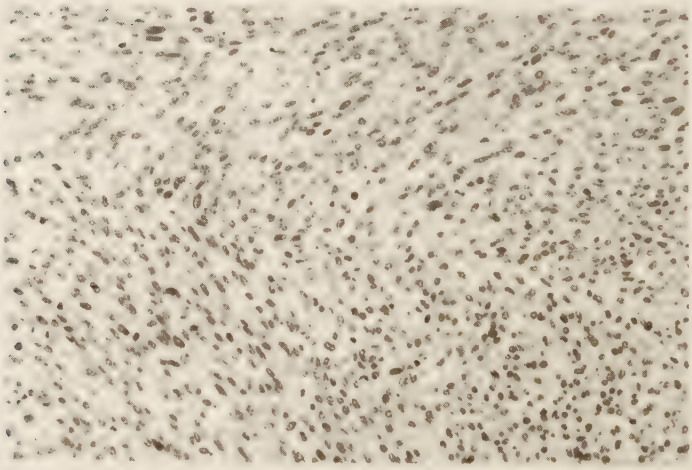
  Der Tumor ist alveolär organisiert mit geringem Stromaanteil. Vereinzelt läßt sich an der den Kapillaren zugewandten Zellschicht Palisadenstruktur erkennen. In dieser und den anliegenden Zellschichten ist die mitotische Aktivität deutlich höher als im Zentrum der Tumorläppchen.



Histologisches Bild: Adenokarzinom 284
Vergrößerung 150 x

b) Fibrosarkom SSK 31

Der zellreiche Tumor hat relativ gleichförmige längsovale bis spindelige Kerne bei geringer Faserbildung. Die Zellenzüge sind faszikulär angeordnet und verlaufen längs und quer.



Histologisches Bild: Fibrosarkom SSK 31
Vergrößerung 235 x

- Proliferationsparameter

Die Proliferationsparameter für das Adenokarzinom 284 wurden in einer Arbeit von Szczepanski und Trott 1975 (18) beschrieben, die für das Fibrosarkom SSK 31 in einer Arbeit von Kummermehr und Trott 1975 (11). Sie wurden aus PLM- ("percent labelled mitosis" = markierte Mitosen in %) Kurven abgeleitet (18).

Für die beiden Tumoren ergaben sich folgende Werte:

	Adenokarzinom 284 (18)	Fibrosarkom SSK 31 (11)
Verdoppelungszeit des Tumorvolumens bei einer Größe von etwa 100 mg	3,0 d	3,0 d
Mittlere Dauer der G1-Phase	4,7 h	4,0 h
Mittlere Dauer der S-Phase	6,8 h	8,5 h
Mittlere Dauer der G2-Phase	1,9 h	2,5 h
Mittlere Zellzykluszeit	13,6 h	15,0 h
Wachstumsfraktion	25 %	50 %
Markierungsindex	12,5 %	23 %
Zellverlustfaktor	0,5	0,6

3. Transplantation

Hierzu wurde einer mit Äther abgetöteten Spendermaus der subkutan gelegene Tumor steril herauspräpariert, in Würfel von etwa 1 mm Seitenlänge aufgeteilt und in isotone NaCl-Lösung gelegt. Nekrotisch erscheinende Tumorteile wurden verworfen. Gleich darauf wurden die Tumorstücke mit einer Kanüle auf die Versuchsmäuse, die vorher mit Äther betäubt wurden, subkutan in eine Thoraxseite transplantiert. An der Implantationsstelle wurde vorher das Fell geschoren, um die Tumoren später genauer messen und beobachten zu können.

4. Messung der Tumorgröße bzw. des Tumorgewichts

Etwa acht bis zehn Tage nach der Transplantation wurde begonnen, die Tumorgewichte mit einer geeichten Plexiglas-schablone, die kreisrunde Löcher mit steigendem Durchmesser

enthielt, zu messen. Jeder Kreisdurchmesser entsprach einem bestimmten Tumorgewicht, das durch bereits vorliegende Kalibrierungsmessungen bestimmt worden war.

Die Zuverlässigkeit eigener Messungen wurde in Vorversuchen auf folgende Weise geprüft und bestätigt. Die nach außen vorstehenden kugeligen Tumoren der verschiedensten Größen wurden so gemessen, daß sie jeweils eine bestimmte Bohrung genau ausfüllten. Anschließend wurden die Mäuse abgetötet, die Tumoren herauspräpariert und gewogen. Für die Versuche konnte das Tumorgewicht auf diese Weise an der lebenden Maus gemessen werden. Wenn das Tumorwachstum ausblieb, sich ein in der Form unregelmäßiger (nicht kugeliger) Tumor oder Doppeltumor entwickelte, wurde die Maus abgetötet.

5. Cytostatikum

Durch intraperitoneale Injektion wurde den Mäusen das in aqua bidest. aufgelöste Cytostatikum Methotrexat (MTX) zur Therapie verabreicht. Die Menge pro Injektion betrug dabei zwischen 0,1 und 0,5 ml.
Methotrexat wurde als Trockensubstanz in Injektionsflaschen von der Firma Lederle Cyanamid GmbH Wolfratshausen bezogen. Eine Injektionsflasche enthielt 5,48 mg bzw. 54,8 mg MTX-Dinatrium in Form von Trockensubstanz, entsprechend 5 mg bzw. 50 mg Methotrexat. Die Injektionsflaschen enhielten keine Konservierungsstoffe.

6. Leucovorin

Benutzt wurden Ampullen zu 1 ml. Ebenso wie Methotrexat stammte auch Leucovorin (L) von der Firma Lederle Cyanamid GmbH Wolfratshausen. Verdünnungen wurden mit aqua bidest. hergestellt. Eine Ampulle zu 1 ml enthielt 3,24 mg Calciumfolinat (wasserfrei) entsprechend 3 mg Folinsäure (wasserfrei), sowie als Konservierungsmittel
0,8 mg p-Hydroxybenzoesäuremethylester und
0,2 mg p-Hydroxybenzoesäurepropylester.
Pro intraperitonealer Injektion erhielt eine Maus höchstens ein Volumen von 0,5 ml gespritzt.

7. Knochenmarkstransplantation

Als Suspensionslösung für die Knochenmarkzellen bei der Knochenmarkstransplantation wurde Hanks-Lösung verwendet. Die Lösung enthielt (mg/l):

NaCL	8000	$CaCl_2$ H_2O-frei	140
$Na_2HPO_4:2H_2O$	60	Glucose	1000
KH_2PO_4	60	Phenolrot	10
$MgSO_4: 7H_2O$	200		

Für jeweils 10 Empfängertiere dienten 3 - 4 unbehandelte Spendertiere derselben Altersgruppe. Die Femura der mit Chloroform abgetöteten Spender wurden herauspräpariert und mit Zellstoff gesäubert. Anschließend wurden die beiden Femurenden abgezwickt, so daß aus der Knochenmarkshöhle des Femurschaftes die Knochenmarkszellen mit steriler Hanks-Lösung herausgespült werden konnten. 1,0 bis 1,5 ml Spüllösung wurde in einer Spritze aufgezogen, die Knochenmarkszellen mit einer feinen Kanüle aus den Röhrenknochen herausgeschwemmt und die so gewonnene Zellsuspension nach guter Durchmischung den Empfängermäusen in einer Menge von 0,1 bis 0,15 ml pro Maus injiziert. Für die Injektion wurde eine der drei Schwanzvenen benutzt, die zuvor durch Eintauchen des Schwanzes in warmes Wasser erweitert worden war.

8. Versuchsdurchführung und -auswertung

Die in die Versuche einbezogenen Tumoren der Tiere wiesen Gewichtsverdoppelungszeiten auf, die beim Fibrosarkom zwischen 2d und 4,5 d und beim Adenokarzinom zwischen 1,5d und 3,5d lagen. Mäuse, deren Tumoren im Laufe des Versuches ulzerierten, wurden aus dem Versuch genommen und abgetötet. Die Mäuse wurden bei einem Tumorgewicht zwischen 57 und 152 mg behandelt. Zu jeder Versuchsgruppe gehörten 5 - 10 Tiere. Daneben lief etwa dieselbe Zahl von unbehandelten Kontrolltieren im Versuch mit, um die Wirkung von Methotrexat auf die behandelten Tiere beurteilen zu können.

Der Tumorwachstumsverlauf für jede einzelne Maus wurde in ein Diagramm eingezeichnet, in dem das Tumorgewicht (mg) im logarithmischen Maßstab gegen die Zeit nach Behandlung (d) aufgetragen wurde. Die Wachstumszeiten der einzelnen Tumoren wurde bestimmt, indem man auf dem Diagramm die Zeit feststellte, die jeder Tumor benötigte, um ab Behandlungsbeginn das zwei-, bzw. fünffache Gewicht zu erreichen.
Für die unbehandelten Kontrolltumoren wurden die Wachstumszeiten festgestellt, indem von dem Gewicht ausgehend, das dem gemittelten Behandlungsgewicht der zugehörigen Versuchsgruppen entsprach, die Zeit bis zum Erreichen des zwei- bzw. fünffachen Tumorgewichts bestimmt wurde. Die Durchschnittswachstumskurven der Tumoren einer Gruppe ergaben sich, indem für jeden Meßtag die geometrischen Mittel aus den einzelnen Tumorgewichtswerten errechnet wurden und in das oben beschriebene Diagramm mit dem zugehörigen mittleren Fehler eingezeichnet wurden.
Jedes Diagramm enthielt die Durchschnittswachstumskurve der Kontrollgruppe und zum Vergleich dazu die Kurven mindestens zweier behandelter Gruppen, die im selben Versuch mitliefen. Letztere wurden parallel zur Abzisse (d) verschoben, bis sie sich am Tag der Behandlung mit der Kontrollkurve deckten. Da die Wachstumskurven der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppen bis zum Behandlungstag annähernd gleich verliefen, wurden die Kurvenverläufe der behandelten Gruppen erst ab dem Behandlungsbeginn eingezeichnet.
In das Diagramm wurden außerdem die nach der Behandlung gestorbenen Mäuse eingetragen und zwar bei dem Tumorgewicht, das an der lebenden Maus zuletzt gemessen wurde, und an dem Tag nach der Behandlung, an dem die Maus tot im Käfig aufgefunden wurde. Deshalb kann der Tod bei zwei- bzw. dreitätigem Meßabstand auch schon ein bzw. zwei Tage vorher eingetreten sein.
Die einzelnen Wachstumszeiten für das zwei bzw. fünffache Tumorgewicht wurden, wenn mindestens vier Tiere nach der Behandlung überlebten, in ein "Wahrscheinlichkeitsnetz" (Schleicher & Schüll, Nr. 423 1/2 A3) eingetragen. Auf der

Abszisse sind im logarithmischen Maßstab die Wachstumszeiten (d) eingetragen, die Ordinate ist nach dem Gauß'schen Integral geteilt und enthält die Häufigkeitssummen in % der Gesamtzahl bzw. die kumulative Häufigkeit (%) der Tumoren einer Gruppe. Diese Skala ist so eingeteilt, daß bei einer log-Normalverteilung der Wachstumszeiten eine Gerade resultiert.
Für jede Versuchsgruppe und zugehörige Kontrollgruppe wurden die geometrischen Mittelwerte der Wachstumszeiten (d) mit den entsprechenden mittleren Fehlern berechnet. Die Differenz der geometrischen Mittelwerte ergab die mittlere Wachstumsverzögerung (d) der behandelten Tumoren gegenüber den unbehandelten.

III. ERGEBNISSE

1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zur Übersicht über alle Versuchsergebnisse dient die Tabelle. Aufgeführt sind alle Versuche, dazu die Zahl der Versuchstiere (n), darunter in Klammern mit einem Kreuz die Zahl der nach der Behandlung gestorbenen Mäuse, der Tumortyp und alle Wachstumszeiten, bis zum Erreichen des zwei-, bzw. fünffachen Gewichts. Die Werte dazu sind nach Größe geordnet, um sie so in das Wahrscheinlichkeitsnetz eintragen zu können. Aus den Einzelwerten wurden die geometrischen Mittel mit dem mittleren Fehler bestimmt. Die Tumorwachstumsverzögerung ergibt sich aus der Differenz der geometrischen Mittel der Wachstumszeiten zwischen behandelter Versuchsgruppe und jeweiliger Kontrollgruppe.

Da die Versuche aufeinander aufbauten und das Ergebnis der vorangegangenen die Planung der folgenden bestimmte, werden die Ergebnisse nicht systematisch sondern in ihrer zeitlichen Aufeinanderfolge dargestellt.

Versuche	n	Typ	Tumorgewicht (d) 2 x	Tumorgewicht (d) 5 x	Tumorgewicht (d) $\bar{x} \pm S.E.$ 2 x	Tumorgewicht (d) $\bar{x} \pm S.E.$ 5 x	Wachstumsverzögerung 2 x (d)	Wachstumsverzögerung 5 x (d)
Kontrolle	10	Ak	1,6; 1,7; 1,7; 1,9; 2,0 2,1; 2,3; 2,4; 2,4; 3,0	4,8; 5,4; 5,6; 5,6; 5,7 5,8; 7,8; 8,3; 8,6;10,7	2,1 1,6..2,2	6,6 6,0..7,2		
30 mg MTX/kg	10	Ak	1,8; 2,6; 2,7; 2,8; 3,1 3,4; 4,0; 4,4; 4,7; 4,8	5,0; 7,0; 7,8; 8,6; 8,6 9,2;10,1;11,2;11,5;15,6	3,5 3,0..3,6	9,1 8,2..10,0	1,2	2,5
60 mg MTX/kg	10	Ak	2,0; 2,1; 2,2; 2,3; 2,5 2,5; 2,6; 3,0; 3,1; 3,2	4,2; 5,7; 5,8; 6,0; 6,2 6,3; 7,6; 7,6; 8,8; 9,4	2,5 2,4..2,6	6,6 6,1..7,1	0,4	0,0
Kontrolle	6	FS	2,2; 2,2; 2,4; 4,0; 4,3 4,4	6,0; 7,8; 9,3;10,2;10,8 11,0	3,1 2,7..3,6	9,0 8,2..9,9		
30 mg MTX/kg	5	FS	2,0; 2,0; 2,0; 2,4; 2,6 2,8; 3,4; 3,4	6,0; 6,0; 6,4; 6,4; 6,8 7,2; 7,5;12,2	2,5 2,3..2,7	7,2 6,6..7,9	-0,6	-1,8
60 mg MTX/kg	6	FS	2,0; 2,4; 2,6; 2,8; 3,2 3,2	6,2; 6,7; 6,8; 8,8; 8,8 10,4	2,7 2,3..2,9	7,8 7,2..8,5	-0,4	-1,2
Kontrolle	8	FS	1,6; 1,8; 2,6; 3,0; 3,8 4,2; 4,8; 5,0	5,0; 6,4; 6,8; 8,4; 9,6 11,0;12,4;12,8	3,1 2,7..3,6	8,7 7,7..9,9		
150 mg MTX/kg	9	FS	2,4; 2,6; 2,6; 2,8; 2,8 3,4; 3,4; 4,0;11,2;	7,4; 7,4; 8,2; 9,4; 9,4 9,4;11,2;11,2 -	3,4 2,9..4,0	9,1 8,6..9,6	0,3	0,4
300 mg MTX/kg	7 (1x)	FS	1,8; 3,6; 3,8; 3,8; 4,6 6,0	6,2; 7,8; 8,0; 9,8; 9,8 9,8	3,7 3,1..4,4	8,5 7,8..9,1	0,6	-0,2
Kontrolle	7	FS	2,0; 2,2; 2,2; 2,4; 2,4 3,6; 3,6	6,4; 7,2; 8,6; 9,4;10,6 11,6;13,0	2,5 2,3..2,7	9,3 8,4..10,2		
3 x 100 mg MTX/kg Intervall 6 h (4x)	10	FS	6,6; 6,8; 8,2; 8,4; 8,8 8,8	13,2;13,4;16,3;19,0;20,0 -	7,9 7,5..8,3	16,1 14,8..17,6	5,4	6,8
3 x 100 mg MTX/kg Intervall 1 h (3x)	10	FS	5,8; 6,4; 6,4; 7,0; 7,0 7,6; 8,8	11,4;12,6;12,8;13,0;14,2 14,6;16,0	6,9 6,6..7,3	13,7 12,9..14,5	4,4	4,4
Kontrolle	6	Ak	1,4; 1,4; 1,6; 1,6; 1,8 2,0	5,0; 5,1; 6,6; 6,7; 7,0 8,1	1,6 1,5..1,7	6,3 5,9..6,8		
3 x 100 mg MTX/kg Intervall 1 h (7x)	10	Ak	3,8; 4,8; 6,8	7,8; 9,6;10,0	5,0 4,2..5,9	9,1 8,4..9,8	3,4	2,8
Kontrolle	3	FS	2,8; 3,0; 4,2	10,6;13,6;14,0	3,3 2,9..3,7	12,8 11,8..13,8		
3 x 50 mg MTX/kg Intervall 3 h	4	FS	5,0; 5,0; 5,2; 5,6	9,8;12,8;13,5; -	5,2 5,1..5,7	11,9 10,3..13,2	1,9	-0,7
Kontrolle	7	AK	1,4; 1,6; 1,6; 1,8; 2,0 2,2; 4,4	5,1; 5,2; 5,4; 6,2; 6,3 7,6;11,9	2,0 1,7..2,3	6,5 5,2..7,3		
5 x 10 mg MTX/kg Intervall 3 h Knochenmark am Tag darauf	9	AK	4,4; 4,8; 4,8; 5,4; 5,4 5,4; 5,4; 5,8; 6,2	6,2; 6,6; 8,6; 9,0;10,5 11,0;11,2;12,8;13,0	5,3 5,1..5,5	10,2 9,6..10,8	3,3	3,7
5 x 20 mg MTX/kg Intervall 3 h Knochenmark am Tag darauf	10 (7x)	AK	4,8; 6,2; 6,4;	- - - -	5,8 5,3..6,3		3,8	
Kontrolle	4	FS	2,6; 2,2; 2,5; 2,8	6,2; 6,6; 6,8; 7,2	2,4 2,2..2,5	6,7 6,5..6,9		
5 x 10 mg MTX/kg Intervall 3 h	6	FS	3,4; 4,6; 5,0; 5,2; 5,4 5,6; 6,2; 6,6	7,2; 8,0; 8,0; 8,0; 8,3 8,4; 9,8;10,2	5,2 4,6..5,6	8,4 8,1..8,8	2,8	1,7
5 x 10 mg MTX/kg Intervall 3 h Knochenmark am Tag darauf	9 (1x)	FS	4,4; 4,4; 4,6; 4,6; 5,0 5,2; 5,2; 5,6	6,6; 7,8; 8,2; 8,2; 8,2 8,8; 9,1; 9,8	4,9 4,7..5,0	8,4 8,0..8,7	2,5	1,6
Kontrolle	10	AK	1,3; 1,4; 1,4; 1,6; 1,6 1,6; 1,6; 1,8; 1,8; 1,9	3,4; 3,7; 4,0; 4,6; 4,8 5,0; 5,1; 5,5; 5,6; 6,0	1,6 1,3..1,7	4,7 4,4..5,0		
100 mg MTX + 10 mg L/kg	6	AK	1,6; 2,0; 2,2; 2,2; 2,2 2,8	3,5; 4,7; 4,8; 5,4; 6,5 7,8	2,1 2,0..2,3	5,3 4,7..5,9	0,5	0,6
2 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg	6	AK	2,0; 3,2; 3,4; 3,4; 3,8 4,4	6,4; 6,4; 6,8; 7,4; 7,4 7,8	3,3 2,9..3,7	7,0 6,8..7,3	1,7	2,3
3 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg	6 (1x)	AK	3,9; 4,0; 4,8; 5,4; 6,6	8,0; 8,0; 8,6; 9,0;11,2	4,8 4,4..5,3	8,9 8,4..9,5	3,2	4,2
4 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg	6 (2x)	AK	4,4; 4,6; 6,3; 6,6	8,2; 9,2;10,4;10,5	5,5 4,9..6,1	9,8 9,0..10,1	3,9	4,8
5 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg	6 (5x)	AK	6,8	10,0	6,8	10,0	5,2	5,3

MTX = Methotrexat
L = Leucovorin
AK = Adenokarzinom
FS = Fibrosarkom
n = Zahl der Tiere
S.E. = Standard Error

Tabelle: Zusammenfassung der Ergebnisse

2. Einzeitbehandlung

Zu Beginn der Versuche wurde Methotrexat in Form einer einmaligen Injektion gegeben. Das Adenokarzinom und das Fibrosarkom wurden mit 30 und 60 mg MTX/kg behandelt (Abb. 1 - 4).

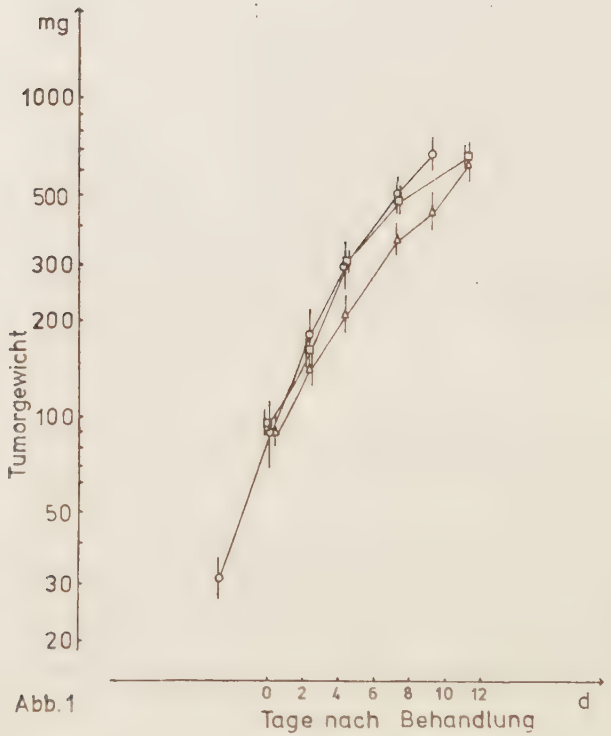


Abb.1

Abb. 1 Adenokarzinom: gemittelte Wachstumskurven

O = Kontrollgruppe (10 Tiere)
Δ = 30 mg MTX/kg (10 Tiere)
□ = 60 mg MTX/kg (10 Tiere)

Die eingezeichneten Grenzen geben den mittleren Fehler des Mittelwertes an.

Für die Wachstumsverzögerungen des Adenokarzinoms ergaben sich folgende Werte

	bei Tumorgewicht	
	2 x	5 x
30 mg MTX/kg	1,2 d	2,5 d
60 mg MTX/kg	0,4 d	0,0 d

Die Abweichungen sind zu klein, um einen Effekt sichern zu können.

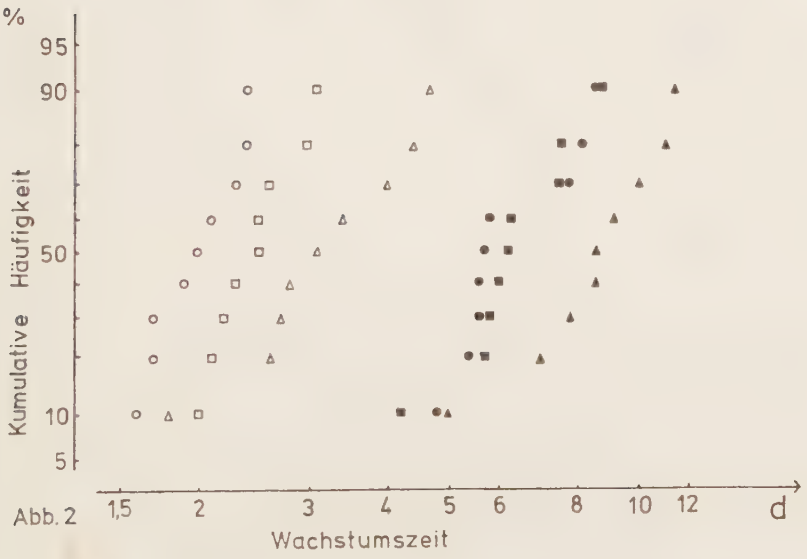


Abb. 2

Abb. 2 Adenokarzinom: Kumulative Verteilung der Wachstumszeiten für Tumorgewicht 2 x (offene Zeichen) und 5 x (ausgefüllte Zeichen)

○ = Kontrolle
△ = 30 mg MTX/kg
□ = 60 mg MTX/kg

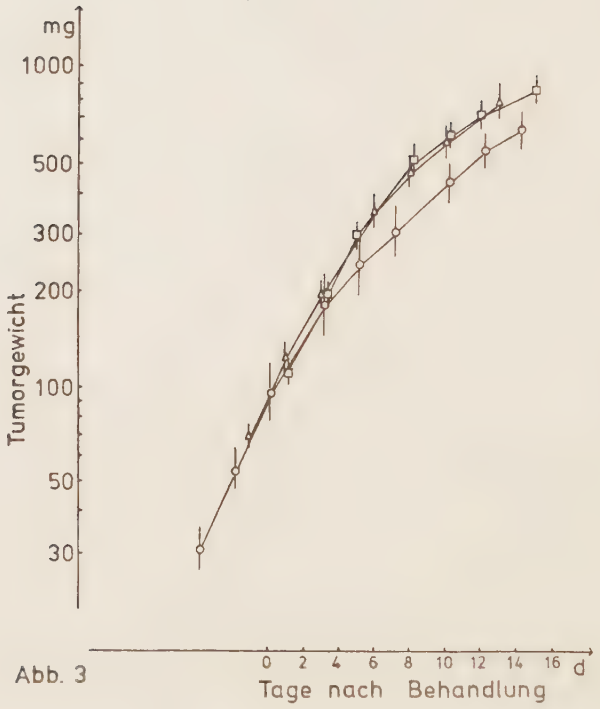


Abb. 3

Abb. 3 Fibrosarkom: gemittelte Wachstumskurven

O = Kontrollgruppe (6 Tiere)
Δ = 30 mg MTX/kg (8 Tiere)
□ = 60 mg MTX/kg (6 Tiere)

Die eingezeichneten Grenzen geben den mittleren Fehler des Mittelwertes an.

Beim Fibrosarkom ergaben sich folgende Wachstumsverzögerungswerte

	bei Tumorgewicht	
	2 x	5 x
30 mg MTX/kg	- 0,6 d	- 1,8 d
60 mg MTX/kg	- 0,4 d	- 1,2 d

Die Ergebnisse liegen im normalen Streubereich. Aus diesem Grund ist in diesen Versuch kein Effekt, auch kein wachstumsfördernder Effekt durch Einzeldosen von Methotrexat nachzuweisen.

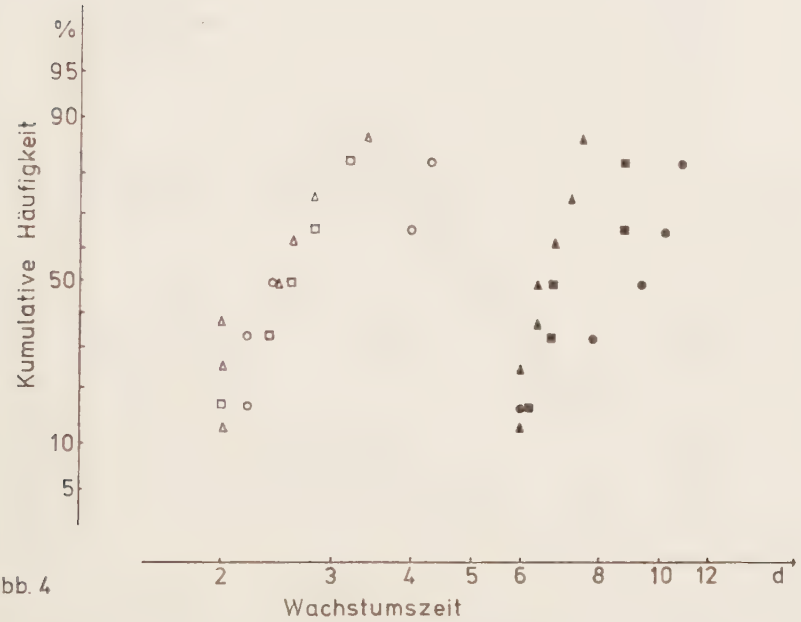


Abb. 4

Abb. 4 Fibrosarkom: Kumulative Verteilung der Wachstumszeiten für Tumorgewicht 2 x (offene Zeichen) und 5 x (ausgefüllte Zeichen)

O = Kontrolle
Δ = 30 mg MTX/kg
□ = 60 mg MTX/kg

Während beim Adenokarzinom lediglich bei der niedrigen Dosis von 30 mg MTX eine geringe Wachstumsverzögerung zu verzeichnen war, wuchsen die Tumoren der Kontrollgruppe beim Fibrosarkom sogar etwas langsamer als die der behan-

delten Gruppe. Wegen dieser Ergebnisse wurde für das Fibrosarkom die Dosis erheblich gesteigert auf 150 und 300 mg MTX/kg (Abb. 5 und 6).

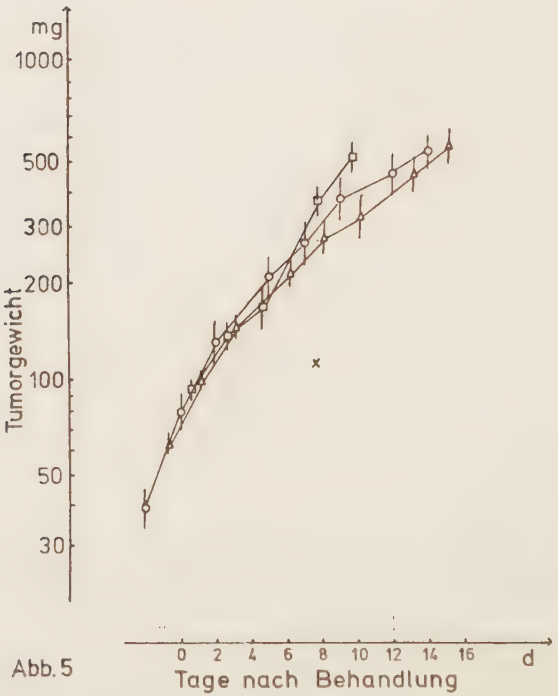


Abb.5

Abb. 5 Fibrosarkom: gemittlete Wachstumskurven
O = Kontrollgruppe (8 Tiere)
Δ = 150 mg MTX/kg (9 Tiere)
□ = 300 mg MTX/kg (7 Tiere) x = 1 tote Maus
Die eingezeichneten Grenzen geben den mittleren Fehler des Mittelwertes an.

Die zugehörigen Wachstumsverzögerungen ergaben folgende Werte

	bei Tumorgewicht 2 x	5 x
150 mg MTX/kg	0,3 d	0,4 d
300 mg MTX/kg	0,6 d	- 0,2 d

Die Letalität bei der hohen Dosis von 300 mg MTX/kg betrug 1/7.

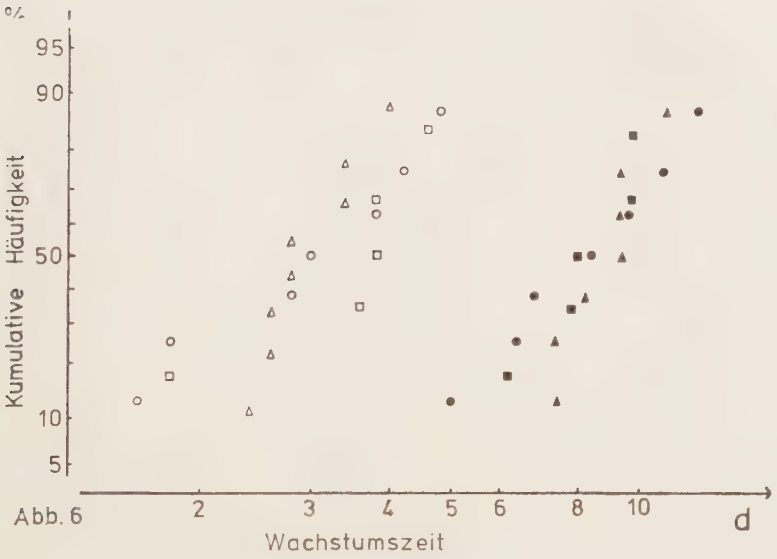


Abb. 6

Abb. 6 Fibrosarkom: Kumulative Verteilung der Wachstumszeiten bei Tumorgewicht 2 x (offene Zeichen) und 5 x (ausgefüllte Zeichen)

○ = Kontrolle
△ = 150 mg MTX/kg
□ = 300 mg MTX/kg

Trotz erheblicher Steigerung der Dosis konnte kein Effekt auf den Tumor erzielt werden.

3. Fraktionierung (3 x), Behandlungsintervall 1 h und 6 h. Dosis bleibt jeweils gleich

Wegen der Wirkungsweise von Methotrexat, die später in der Diskussion noch näher ausgeführt wird, lag es nahe, das Cytostatikum fraktioniert zu verabreichen, um einen Effekt auf den Tumor zu erzielen. Die hohe Dosis von 300 mg MTX/kg wurde in drei Fraktionen verabreicht, wobei die Behandlungsintervalle für zwei Versuchsgruppen zunächst für das Adenokarzinom (Abb. 7) 1 h und 6 h betrugen.

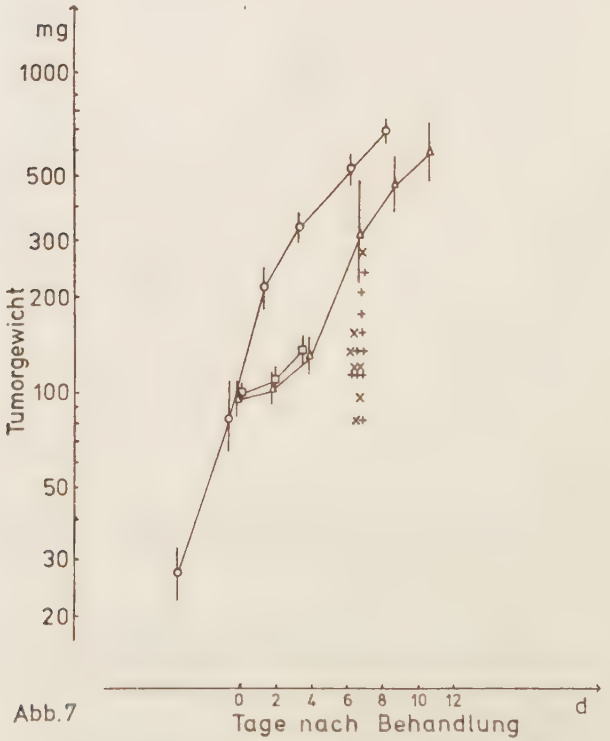


Abb.7

Abb. 7 Adenokarzinom: gemittelte Wachstumskurven
0 = Kontrollgruppe (6 Tiere)
Δ = 3 x 100 mg MTX/kg Intervall 1 h (10 Tiere)
x = 1 tote Maus
□ = 3 x 100 mg MTX/kg Intervall 6 h (10 Tiere)
+ = 1 tote Maus
Die eingezeichneten Grenzen geben den mittleren Fehler des Mittelwertes an.

Beim Adenokarzinom betrug die Wachstumsverzögerung

	bei Tumorgewicht	
	2 x	5 x
3 x 100 mg MTX/kg Intervall 1	3,4 d	2,6 d

Bei beiden Versuchsgruppen zeichnete sich eine deutliche Wirkung auf den Tumor ab, die allein durch die Fraktionierung zu erklären ist. Ebenso stieg die Letalität beim 1 h-Intervall auf 7/10 und beim 6 h-Intervall auf 10/10. Deswegen konnte für das 6 h-Intervall keine Wachstumsverzögerungszeit ermittelt werden und für beide Intervalle keine kumulative Verteilung der Wachstumszeiten aufgezeichnet werden.

Der gleiche Versuch wurde mit dem Fibrosarkom durchgeführt (Abb. 8 und 9)

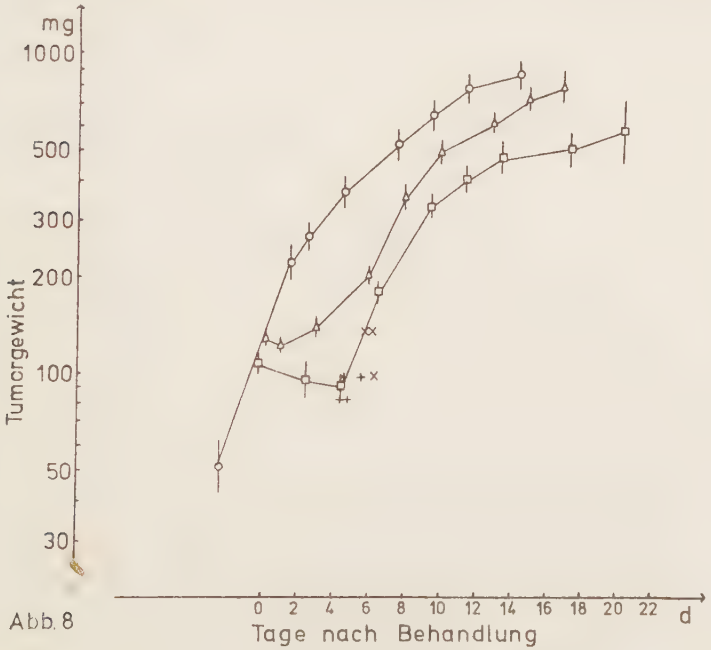


Abb. 8

Abb. 8 Fibrosarkom: gemittelte Wachstumskurven
○ = Kontrollgruppe (7 Tiere)
△ = 3 x 100 mg MTX/kg Intervall 1 h (10 Tiere)
x = 1 tote Maus
□ = 3 x 100 mg MTX/kg Intervall 6 h (10 Tiere)
+ = 1 tote Maus
Die eingezeichneten Grenzen geben den mittleren Fehler des Mittelwertes an.

Die Wachstumsverzögerungen für das Fibrosarkom ergaben folgende Werte

	bei Tumorgewicht 2 x	5 x
3 x 100 mg MTX/kg Intervall 6 h	5,4 d	6,8 d
3 x 100 mg MTX/kg Intervall 1 h	4,4 d	4,4 d

Beim 1 h-Intervall war die Verzögerung 1 - 2 d kürzer als beim 6 h-Intervall. Im Vergleich zum Adenokarzinom wurde beim 1 h-Intervall das Tumorwachstum um 1 - 1,5 d länger verzögert. Die Letalität fiel beim Fibrosarkom mit 3/10 beim 1 h-Intervall und mit 4/10 beim 6 h-Intervall signifikant geringer aus als beim Adenokarzinom.

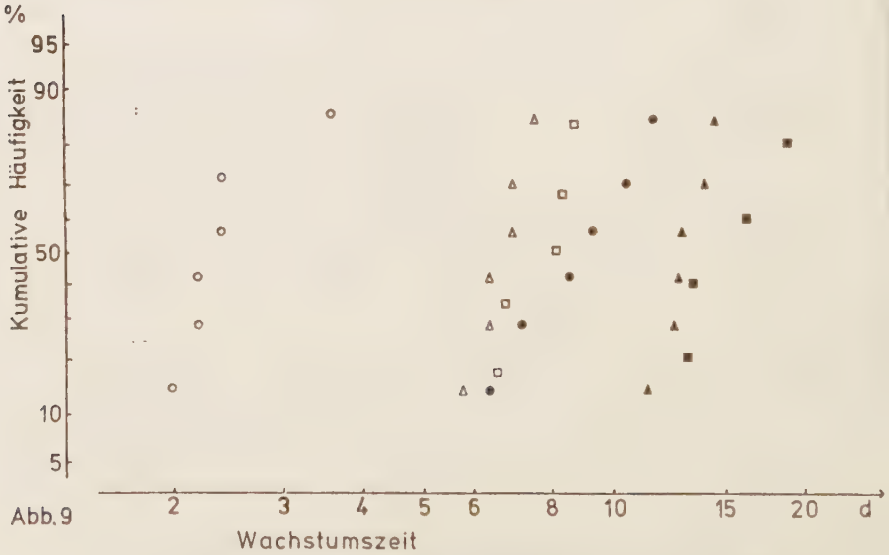


Abb.9

Abb. 9 Fibrosarkom: Kumulative Verteilung der Wachstumszeiten bei Tumorgewicht 2 x (offene Zeichen) und 5 x (ausgefüllte Zeichen)

○ = Kontrolle
△ = 3 x 100 mg MTX/kg Intervall 1 h
□ = 3 x 100 mg MTX/kg Intervall 6 h

Insgesamt kann man keinen signifikanten Unterschied zwischen Adenokarzinom und Fibrosarkom in Bezug auf die Wachstumsverzögerung feststellen.

4. Fraktionierung (3 x und 5 x) Behandlungsintervall 3 h und 12 h. Dosis bleibt jeweils gleich

Um eine bessere Übersicht über Tumorwirkung und Grenzen der Letalität zu gewinnen, wurde die Dosis halbiert auf 150 mg MTX/kg, die Zahl der Fraktionen und Intervalle für drei Versuchsgruppen beim Fibrosarkom geändert (Abb. 10).

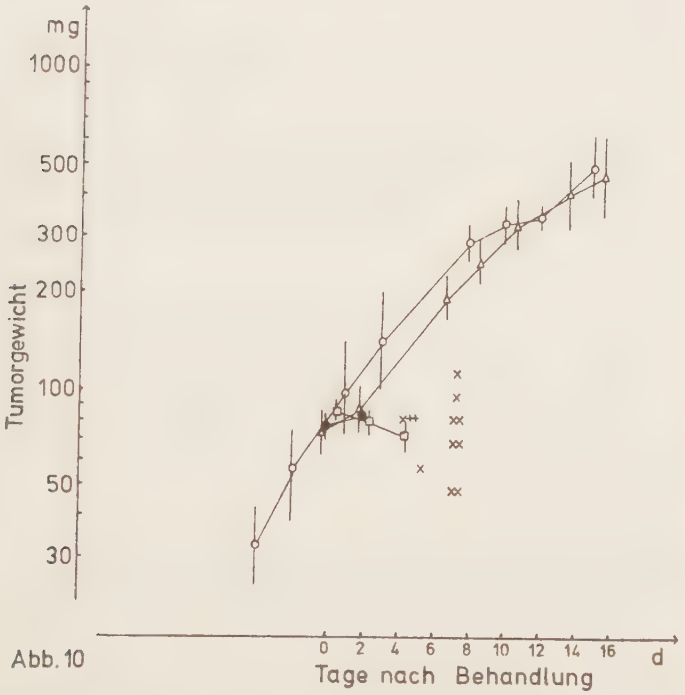


Abb. 10

Abb. 10 Fibrosarkom: gemittelte Wachstumskurven
0 = Kontrollgruppe (3 Tiere)
Δ = 3 x 50 mg MTX/kg Intervall 3 h (4 Tiere)
□ = 5 x 30 mg MTX/kg Intervall 3 h (10 Tiere)
x = 1 tote Maus
● = 3 x 50 mg MTX/kg Intervall 12 h (2 Tiere)
+ = 1 tote Maus
Die eingezeichneten Grenzen geben den mittleren Fehler des Mittelwertes an.

Bei der Gruppe mit den fünf Fraktionen beim 3 h-Intervall war die deutlichste Wirkung auf den Tumor zu sehen. Der Tumor wuchs bis zum Tod der Mäuse zwischen 4. und 7. Tag nach Behandlung nicht mehr weiter (Letalität 10/10). Im Vergleich dazu konnte man bei der Gruppe mit dem selben Intervall bei nur drei Fraktionen nur einen geringen Effekt verzeichnen mit folgenden Werten für die Wachstumsverzögerungen

	bei Tumorgewicht 2 x	5 x
3 x 50 mg MTX/kg Intervall 3 h	1,9 d	- 0,7 d

Der Wert für das fünffache Tumorgewicht ist allerdings unzuverlässig, weil eine von vier Mäusen wegen Wachstumsstillstand des Tumors aus der Messung der Verzögerungszeit herausgefallen ist.

Steigerte man bei drei Fraktionen das Behandlungsintervall von 3 h auf 12 h, so starben die Versuchstiere wieder vorzeitig - in die Gruppe wurden deswegen keine weiteren Tiere genommen - das Tumorwachstum stand bis zum Tod der Mäuse still. Wegen der hohen Letalität wurde darauf verzichtet, den gleichen Versuch mit dem Adenokarzinom durchzuführen.

5. <u>Fraktionierung (5 x) Behandlungsintervall 3 h Knochenmarkstransplantation, Veränderung der Dosis</u>

Alle bisherigen Versuche hatten gezeigt, daß die Wirkung auf den Tumor umso größer war, je länger Methotrexat auf ihn einwirken konnte. Beim nächsten Versuch wurden daher die fünf Fraktionen bei 3 h-Intervall beibehalten. Um die Letalität zu senken, wurde die Gesamtdosis auf 50 und 100 mg MTX/kg verringert. Da aber beim ersten Versuch mit Adenokarzinom wieder kein Versuchstier überlebte, versuchten wir die Letalität zu senken, indem wir am ersten Tag nach der Behandlung Knochenmark von Mäusen desselben Stammes transplantierten. Die Maßnahme brachte

den gewünschten Erfolg. Bei der Gruppe mit 50 mg MTX/kg überlebten alle neun Tiere und bei der Gruppe mit 100 mg MTX/kg von zehn Tieren drei (Abb. 11 und 12). Die Letalität verringerte sich also durch die Knochenmarkstransplantation bei der Dosis von 50 mg MTX/kg von 10/10 auf 0 und bei der Dosis von 100 mg MTX/kg von 10/10 auf 7/10.

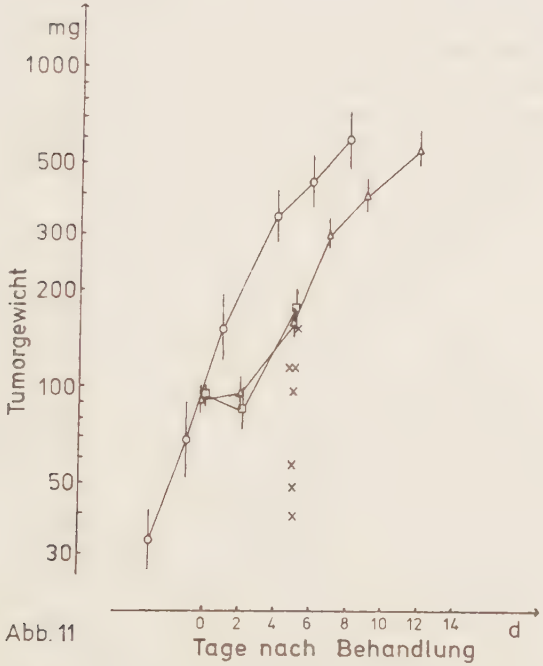


Abb. 11

Abb. 11 Adenokarzinom: gemittelte Wachstumskurven
O = Kontrollgruppe (7 Tiere)
Δ = 5 x 10 mg MTX/kg Intervall 3 h (9 Tiere)
Knochenmark am Tag darauf
□ = 5 x 20 mg MTX/kg Intervall 3 h (10 Tiere)
x = 1 tote Maus
Knochenmark am Tag darauf
Die eingezeichneten Grenzen geben den mittleren Fehler des Mittelwertes an.

Die Wachstumsverzögerungen beim Adenokarzinom betrugen

		für Tumorgewicht 2 x	5 x
5 x 10 mg MTX/kg Intervall 3 h	Knochen-mark	3,3 d	3,7 d
5 x 20 mg MTX/kg Intervall 3 h	am Tag darauf	3,8 d	---

Der Verzögerungswert für fünffaches Tumorgewicht konnte bei der Gruppe mit der Gesamtdosis von 100 mg MTX/kg nicht ermittelt werden, weil die Tiere auf Grund eines Irrtums der Versuchsdurchführung zu früh abgetötet wurden.

Die Wirkung auf den Tumor war bei der höheren Dosis von 100 mg MTX/kg nur geringfügig besser. Wegen der hohen Letalität bei 100 mg MTX/kg von 7/10 konnten die Wachstumszeiten nur für 50 mg MTX/kg in das Wahrscheinlichkeitsnetz eingetragen werden (Abb. 12).

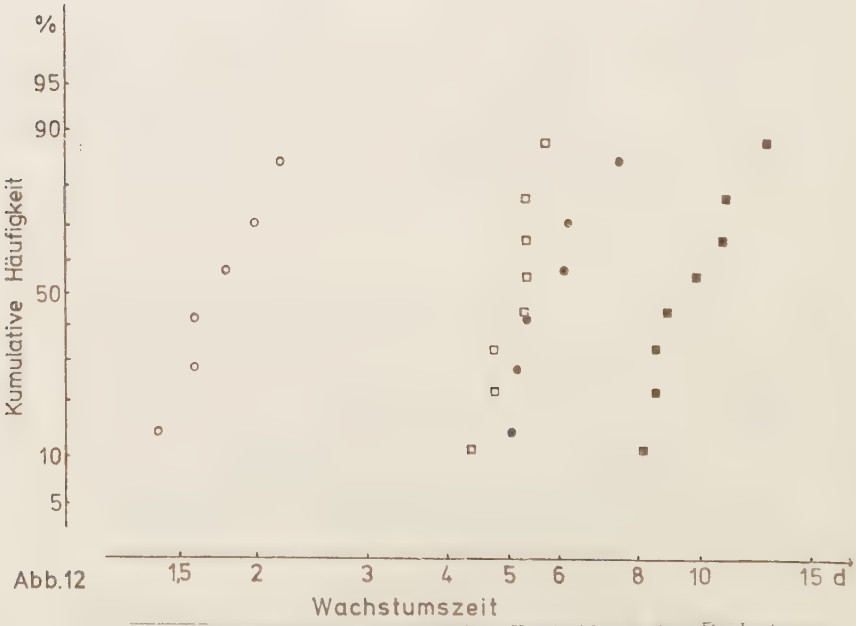


Abb.12

Abb. 12 Adenokarzinom: Kumulative Verteilung der Wachstumszeiten bei Tumorgewicht
2 x (offene Zeichen) und
5 x (ausgefüllte Zeichen)
○ = Kontrolle
□ = 5 x 10 mg MTX/kg Intervall 3 h, Knochenmark am Tag darauf

Mit dem Fibrosarkom wurde der gleiche Versuch durchgeführt, aber nur mit der geringeren Gesamtdosis von 50 mg MTX/kg, wobei die eine Versuchsgruppe Knochenmark am Tag nach der Behandlung erhielt, die andere Gruppe nicht (Abb. 13). Im Vergleich zum ersten Versuch beim Adenokarzinom mit der Dosis von 50 mg MTX/kg (ohne Knochenmarkstransplantation) fiel die Letalität bei gleicher Dosis zur Gruppe ohne Knochenmarkstransplantation von 10/10 auf 0 und zur Gruppe mit Knochenmarkstransplantation von 10/10 auf 1/10.

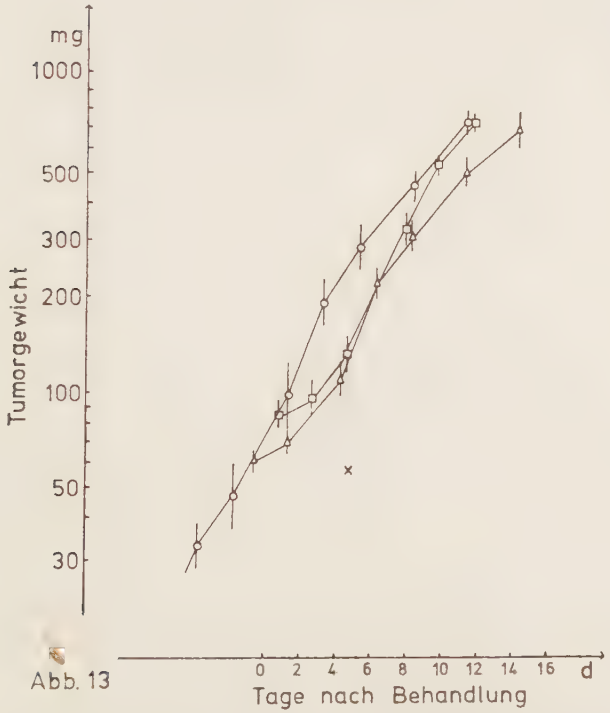


Abb. 13

Abb. 13 Fibrosarkom: gemittelte Wachstumskurven
O = Kontrollgruppe (4 Tiere)
Δ = 5 x 10 mg MTX/kg Intervall 3 h (8 Tiere)
□ = 5 x 10 mg MTX/kg Intervall 3 h (9 Tiere)
x = 1 tote Maus
Knochenmark am Tag darauf
Die eingezeichneten Grenzen geben den mittleren Fehler des Mittelwertes an.

In den Wachstumsverzögerungszeiten bestand zwischen beiden Gruppen so gut wie kein Unterschied

	bei Tumorgewicht 2 x	5 x
5 x 10 mg MTX/kg Intervall 3 h	2,8 d	1,7 d
5 x 10 mg MTX/kg Intervall 3 h Knochenmark am Tag darauf	2,5 d	1,6 d

Gegenüber dem Adenokarzinom war die Verzögerung um etwa 1 d kürzer. Die Letalität betrug bei der Gruppe, die Knochenmark erhielt, 1/10 gegenüber 0 bei der anderen Gruppe. Die kumulative Verteilung der Wachstumszeiten zeigt in Abb. 14 einen äußerst geringen mittleren Fehler von höchstens 0,4 d.

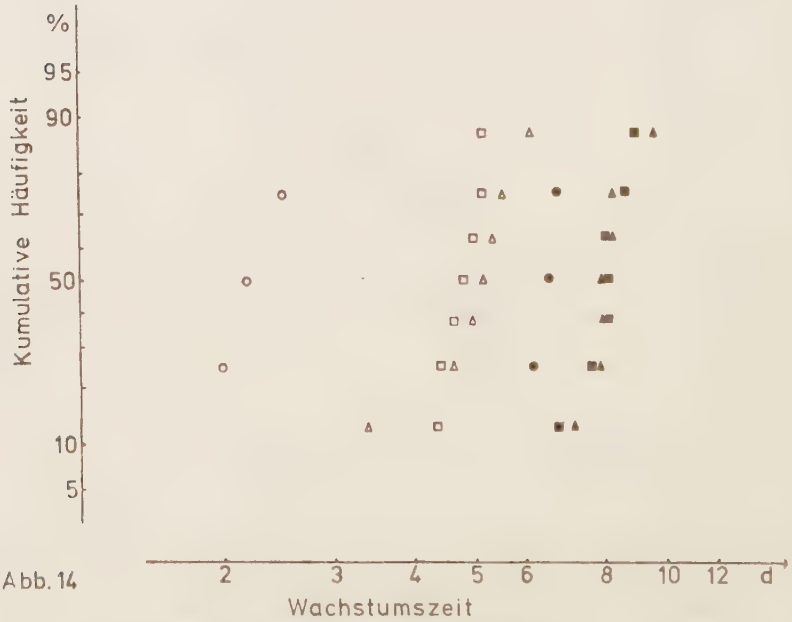


Abb. 14

Abb. 14 Fibrosarkom: Kumulative Verteilung der Wachstumszeiten bei Tumorgewicht
2 x (offene Zeichen) und
5 x (ausgefüllte Zeichen)
0 = Kontrolle
Δ = 5 x 10 mg MTX/kg Intervall 3 h
□ = 5 x 10 mg MTX/kg Intervall 3 h, Knochenmark am Tag darauf

6. Fraktionierung von 1 x bis 5 x, Behandlungsintervall 24 h, dazu Leucovorin

Wenn man bei den bisherigen Versuchen eine längere Wachstumsverzögerung der Tumoren erzielen wollte, mußte damit immer eine hohe Letalität der Versuchstiere in Kauf genommen werden. Also wurde nun jeweils 1 h nach der Behandlung mit Methotrexat Leucovorin (L) gegeben. Die Gesamtdosis und damit auch die Fraktionszahl und Behandlungsdauer wurden mit jeder Versuchsgruppe für Adenokarzinom wie folgt erhöht (Abb. 15).

Die Wachstumsverzögerungen betrugen

		bei Tumorgewicht 2 x	5 x
a) 100 mg MTX + 10 mg L/kg		0,5 d	0,6 d
b) 2 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg	Inter-	1,7 d	2,3 d
c) 3 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg	vall	3,2 d	4,2 d
d) 4 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg	24 h	3,9 d	4,8 d
e) 5 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg		>5 d	>5 d

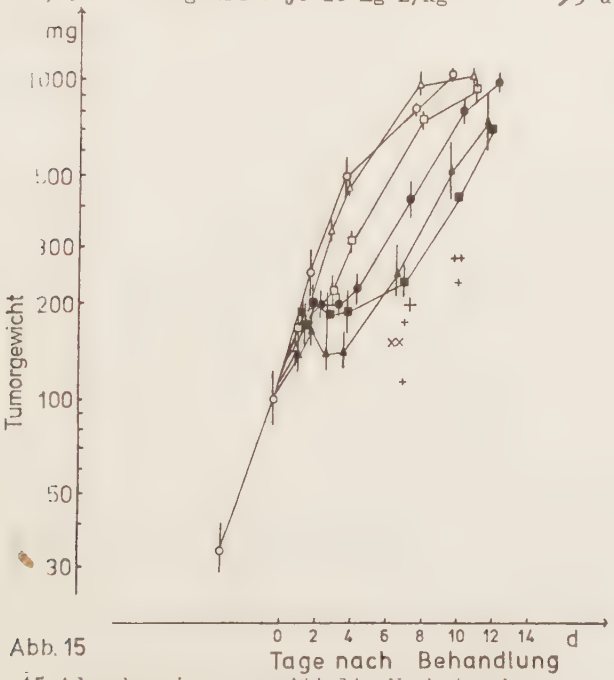


Abb. 15

Abb. 15 Adenokarzinom: gemittelte Wachstumskurven
○ = Kontrollgruppe (10 Tiere)
△ = 100 mg MTX + 10 mg L/kg (6 Tiere)
□ = 2 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg Inter-
● = 3 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg vall ┼ = 1 tote Maus
▲ = 4 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg 24 h x = 1 tote Maus
■ = 5 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg (je 6 + = 1 tote Maus
Tiere)
Die eingezeichneten Grenzen geben den mittleren Fehler des Mittelwertes an.

Die Letalität stieg mit zunehmender Dosis von 1/6 bei Gruppe c) auf 2/6 bei Gruppe d) bis auf 5/6 Mäuse bei Gruppe e). Kontinuierlich ansteigend wurde das Tumorwachstum von Gruppe a) - e) gestört. Der Wachstumsverzögerungswert für Gruppe e) konnte nur mit Vorbehalt verwendet werden, weil nur eins von sechs Tieren in die Wertung einbezogen werden konnte. Aber auch alle gestorbenen Mäuse dieser Gruppe wiesen eine mindestens gleich lange Wachstumsverzögerung auf.

Die kumulative Verteilung der Wachstumszeiten zeigen Abb. 16 und Abb. 17.

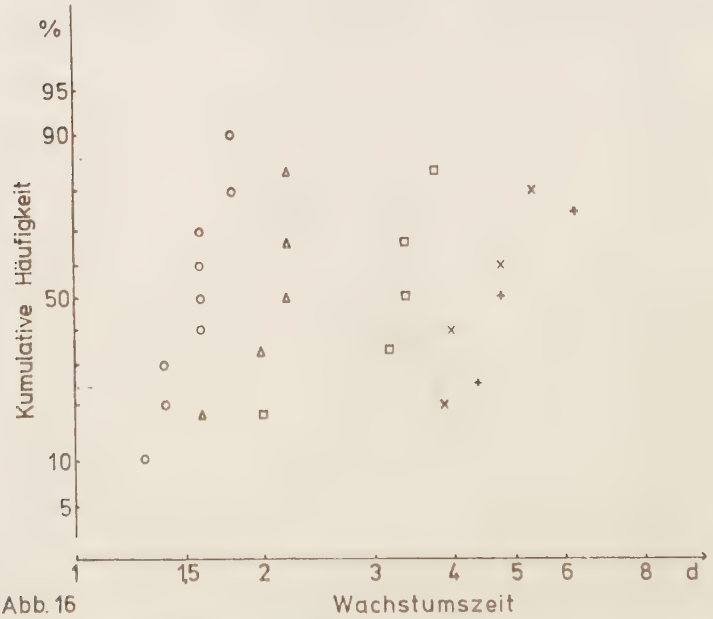


Abb. 16

Abb. 16 Adenokarzinom: Kumulative Verteilung der Wachstumszeiten bei Tumorgewicht 2 x
0 = Kontrolle
Δ = 100 mg MTX + 10 mg L/kg
□ = 2 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg
x = 3 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg
+ = 4 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg

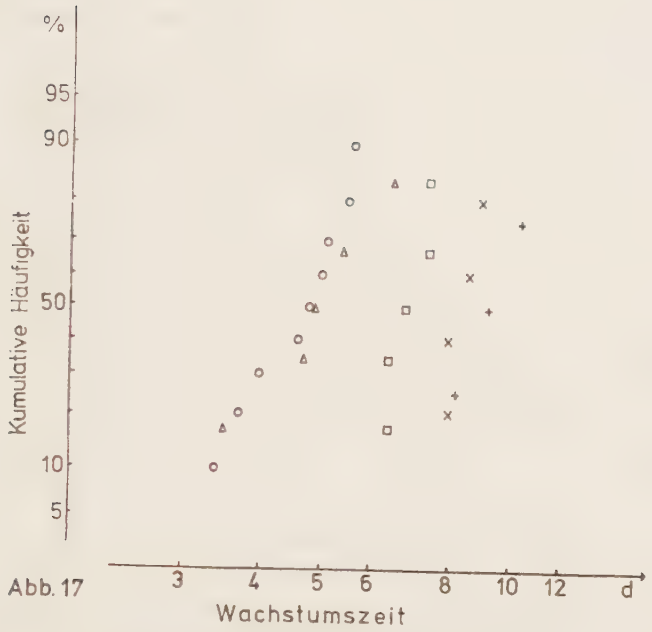


Abb. 17

Abb. 17 Adenokarzinom: Kumulative Verteilung der Wachstumszeiten bei Tumorgewicht 5 x
O = Kontrolle
Δ = 100 mg MTX + 10 mg L/kg
□ = 2 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg
X = 3 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg
\+ = 4 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg

Da in diesem Versuch bei gleichem Zeitintervall die Dosis und die Fraktionen gleichmäßig erhöht wurden, ließ sich die Wachstumsverzögerung hier besonders gut in einer Dosiseffekt- bzw. Wirkungszeiteffektkurve darstellen (Abb. 18). Die Kurve zeigt sehr deutlich vor allem für die Wachstumsverzögerungswerte bei fünffachem Tumorgewicht, wie der Effekt auf den Tumor bis zum 3. Behandlungstag, d.h. bis 300 mg MTX/kg Gesamtdosis gleichmäßig zunimmt. Ab dem 3. Behandlungstag zeigt die abgeflachte Phase der Kurve die geringere Wirkungszunahme an. Genau den umgekehrten Verlauf nimmt die Letalitätskurve, bei der die steile Phase ab dem 4. Behandlungstag bei 400 mg MTX/kg beginnt.

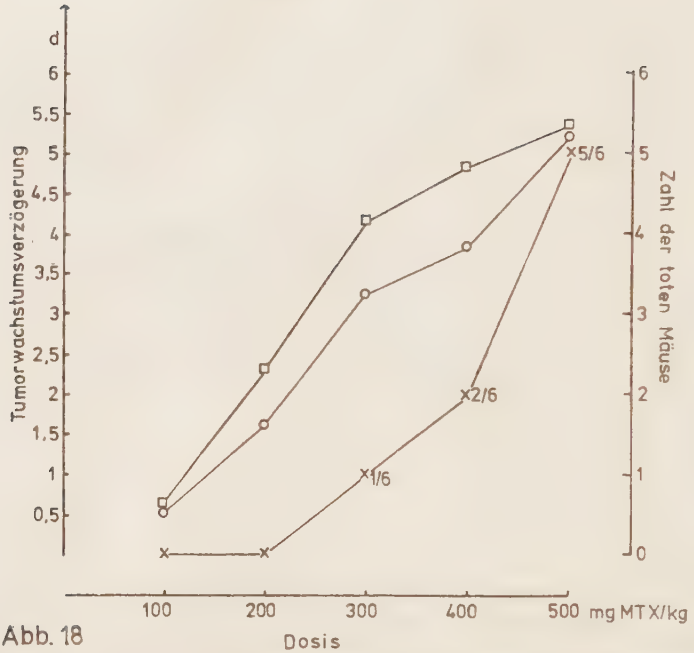


Abb. 18

Abb. 18 Dosiseffektkurve, auf der die Tumorwachstumsverzögerung gegen die Gesamtdosis aufgetragen ist. Tumorwachstumsverzögerung bei
O = Tumorgewicht 2 x
□ = Tumorgewicht 5 x
Parallel dazu wurde mit x die Letalitätskurve in Abhängigkeit von der Dosis eingezeichnet.

Betrachten wir die einzelnen Durchschnittswachstumskurven (Abb. 15), so kommt man zu folgenden Erkenntnissen:

- Die Einzeitbehandlung bringt, wie im ersten Versuch, keinen Effekt auf das Tumorwachstum.
- Erst nach der zweiten Dosisfraktion ändert sich der Kurvenverlauf, so daß man von einem Ansprechen des Tumors auf Methotrexat sprechen kann.
- Ab dem dritten Behandlungstag nimmt das Tumorgewicht ab oder bleibt zumindest gleich.
- Ab der dritten Fraktion beginnt die Letalität und steigt dann stärker an als der Effekt auf den Tumor.

Für den letzten Versuch wurden nur Mäuse mit Adenokarzinom behandelt. Denn in den bis jetzt durchgeführten Versuchen haben das Fibrosarkom und das Adenokarzinom nicht wesentlich verschieden auf Methotrexat angesprochen. Alle Versuche haben gezeigt, daß vor allem die Behandlungsdauer den Therapieerfolg von Methotrexat bestimmt.

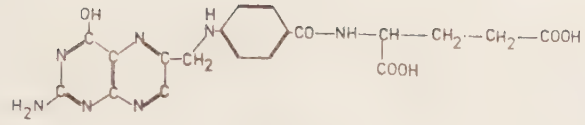
IV. DISKUSSION

1. Wirkungsweise von Methotrexat

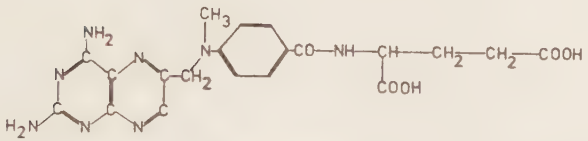
Methotrexat ist ein 4-Amino 10-Methyl-Analog der Folsäure und ein wirkungsvoller Hemmer des Enzyms Dihydrofolsäure-reduktase (DHFR). Der Folsäureantagonist hat eine extrem niedrige Hemmungskonstante (ca. 10^{-10} M*) und bindet in einer stöchiometrischen Art an die DHFR bei pH. 6,0. Bei mehr alkalischem pH bindet es weniger stark, und die Bindung ist kompetitiv mit dem Substrat Dihydrofolsäure (FH_2). Methotrexat hat ähnliche Bindungsaffinitäten für Dihydrofolsäurereduktase bei normalen Säugetiergeweben und bei neoplastischen Geweben. Somit hängt die Wirkung dieses Agens gegen Tumore von anderen Überlegungen ab, so wie Unterschieden zwischen normalen und neoplastischen Zellen in den Wachstumsraten, in den Folsäure-Coenzym-Pools, in der Menge der Dihydrofolsäurereduktase, in den Transportraten in die Zellen und der Diffusionsrate aus den Zellen,der Gegenwart von Reparaturenzymen zur Bildung der Purinnukleotide und von Thymidin und der Syntheserate des Enzyms Dihydrofolsäurereduktase (1) (Abb. 19 und 20). Alle diese Faktoren sollten in die Überlegung mit einbezogen werden, die Effektivität von Methotrexat als eine Folge der Mitteldosierung und des Therapiemodus zu sehen (21).

---

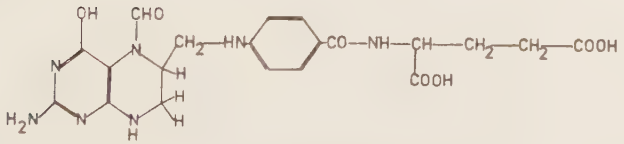
*M = molar



Folsäure



METHOTREXAT
Amethopterin



LEUCOVORIN
Folinsäure, Citrovorumfaktor

Abb. 19

Abb. 19 Chemische Struktur von Folsäure, Methotrexat und Leucovorin

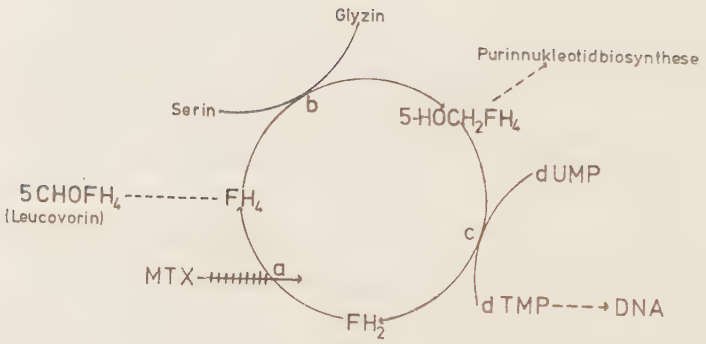


Abb. 20

Abb. 20 Weg der Thymidylatsynthese und Hemmung der Dihydrofolatreduktase durch Methotrexat
a = Dihydrofolatreduktase
b = Serintranshydroxymethylase
c = Thymidylatsynthetase
(nach J.R. Bertino (1))

Als Folge der DNA-Synthese-Hemmung durch Methotrexat sind die Zellen unfähig, genügend DNA für die folgende Teilung zu synthetisieren und es kommt zur Megaloblastenbildung, da die RNA- und Proteinsynthese weitergeht, während die DNA-Bildung stillsteht. An einem kritischen Punkt erfolgt der Zelltod (7). Als Inhibitor der DNA-Synthese ist Methotrexat in der S-Phase des Zellzyklus wirksam. Besonders stark inaktiviert der Antimetabolit rasch proliferierende Zellgruppen. Dies beruht darauf, daß durch die höhere Zellumsatzrate auch eine größere Fraktion der Gesamtzellpopulation während der Medikamenteneinwirkung die sensitive Phase des Zellzyklus durchläuft (10).

Zum besseren Verständnis seien hier einige proliferative Eigenschaften von Zellpopulationen aufgezeigt (16). Alle proliferierenden Zellen machen einen Zellzyklus durch, der in vier Phasen eingeteilt wird.

G_1 = post-mitotische, prä DNA-Synthese-Phase
S = DNA-Replikation
G_2 = post-DNA-Synthese, prä-mitotische Phase
M = Mitose

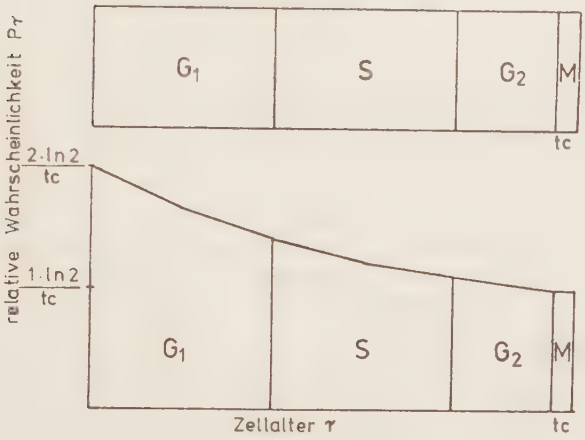


Abb. 21

Abb. 21 Altersverteilungsdiagramm von asynchron proliferierenden Zellpopulationen im steady-state-Zustand (oben) und im exponentiellen Wachstum (unten).

tc = Zellzykluszeit
τ = Zellalter in Einheiten von tc (= Mitteldauer eines Zellzyklus der proliferierenden Zellen)
Pτ = Wahrscheinlichkeit, eine Zelle im Alter τ zu finden
(nach M.F. Rajewski (16))

Die Rechteckform im oberen Teil von Abb. 21 ist dadurch zu erklären, daß die eine der zwei Zellen nach der Teilung die Zellpopulation verläßt. In Abb. 21 unten verdoppelt sich die Zellzahl nach der Teilung (16).

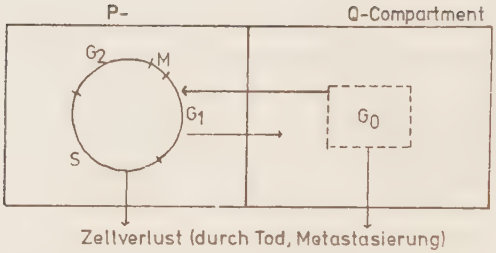


Abb. 22

Abb. 22: Diagramm eines Zellsystems zusammengesetzt aus proliferierenden (P-) und nicht proliferierenden Zellen (Q-).
(nach M.F. Rajewski (16))

In dem Modell in Abb. 22 stellt man sich das Q-Kompartiment als eine Untergruppe von nicht proliferierenden Zellen vor. Davon befinden sich einige in einem funktionellen "Go"-Status mit der Möglichkeit, die Proliferation unter passenden Bedingungen wieder aufzunehmen.
Die Existenz eines Anteils von nicht proliferierenden Zellen (Q-) in Tumoren ist nachgewiesen (8, 11, 12, 18). Er liegt zwischen wenigen und 99 % aller Tumorzellen je nach Tumorhistologie. Das erklärt die geringen Aussichten, einen soliden Tumor mit zellzyklusphasenspezifischen Mitteln wie Methotrexat zu heilen (20).

Bei Tumoren könnte der Status "Go" u.a. auch von einem Mangel an essentiellen Nahrungsbestandteilen herrühren, durch die typische insuffiziente Gefäßversorgung. Werden die Ernährungsbedingungen wieder besser, z.B. durch Verkleinerung des Tumors unter der Behandlung, so können solche "Go"-Zellen rekrutiert werden, d.h. proliferative Funktionen wieder übernehmen. Bei der Behandlung eines Tumors kämen dann solche rekrutierte Zellen wieder in die sensitive S-Phase und könnten ebenfalls abgetötet werden (12, 15, 20).

Im Falle von Methotrexat als DNA-Synthese-Hemmer sei auf eine Überlegung (3) hingewiesen, wonach Methotrexat auch die RNA-Synthese via Hemmung von de novo Purinnukleotid sowie die Proteinsynthese behindern könnte. Demnach wurde angedeutet, daß Methotrexat ein "selbstbegrenzender" Hemmer des Zellwachstums ist, da durch den Stop der RNA- und Proteinsynthese metabolische Ungleichgewichte, die durch die DNA-Bildungsstörung verursacht werden, korrigiert würden. Diese Überlegung kann man in einem Zellzyklus bildlich darstellen (3).

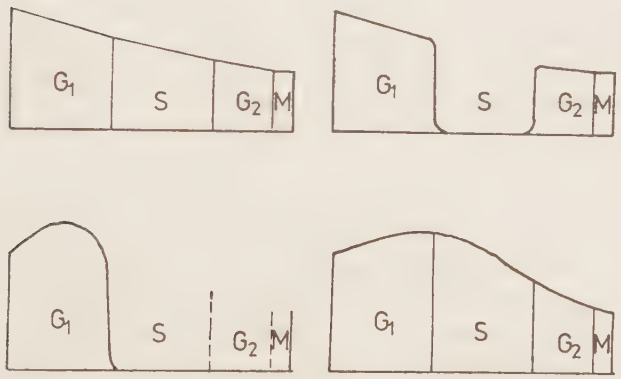


Abb. 23

Abb. 23 Altersverteilungsdiagramme von asynchron proliferierenden Zellpopulationen im exponentiellen Wachstum unter Anwesenheit von Methotrexat (aus G.G. Steel (20)).

Methotrexat tötet die Zellen in der S-Phase ab. Die Zellen gehen von G_2 über M in die G_1-Phase. Die Zellen werden beim Übergang von der G_1 in die S-Phase durch Methotrexat blockiert. Dadurch wird Methotrexat zu einem selbstbegrenzenden Agens, da keine Zellen mehr in die S-Phase einströmen. Es folgt eine Zellansammlung in der

G_1-Phase. Nach der Elimination von Methotrexat gehen die überlebenden Zellen wieder durch den Zellzyklus und stellen schrittweise die exponentielle Altersverteilung wieder her (Abb. 23).

Nach Borsa, Whitmore begrenzt sich Methotrexat also selbst in der Wirkung, indem es die Zellen daran hindert, mit der DNA-Synthese zu beginnen. So hält es diese Zellen von der empfindlichen Phase des Zellzyklus fern. Lang anhaltende hohe Methotrexat-Konzentrationen hätten also eine begrenzte Zelltötungswirkung, wenn der Übergang von der G_1 in die S-Phase dauernd verhindert würde. Intermittierende Verabreichung von Methotrexat müßte dagegen zum Abtöten von viel mehr Zellen führen, denn zwischen den Fraktionen könnten wieder weitere Zellen in die S-Phase gelangen, in der sie dann durch die nächste Methotrexat-Fraktion abgetötet würden.

Diese These steht im Gegensatz zu den Befunden von Eichholz und Trott (8), die den Verlauf des Zelltodes an B14-Zellen in vitro studiert haben. Sie fanden keinen Hinweis, daß chinesische Hamster-Zellen durch Methotrexat davon abgehalten werden, in die sensitive S-Phase zu gehen, wenigstens für 148 h, da die Überlebensfraktion mit anwachsender Expositionsdauer exponentiell abnimmt und zwar bis zu Überlebensfraktionen, die viel niedriger sind als nach dem Markierungsindex zu erwarten wäre. D.h. trotz dauernder Anwesenheit von Methotrexat wurden auch Zellen abgetötet, die nicht in der S-Phase waren, also erst in diese gelangen mußten.

2. Pharmakokinetik von Methotrexat

Methotrexat wird zum größten Teil in den ersten 24 h nach Verabreichung ausgeschieden. Die Halbwertszeit im Serum der Maus beträgt bis 4 h nach Verabreichung 31 Min., nach mehr als 4 h verlängert sich diese auf 12 h (Abb. 24) (4).

Beim Menschen werden sowohl nach oraler als auch nach parenteraler Anwendung von Methotrexat 54 - 88 % der applizierten Dosis während der ersten 24 h unverändert

über die Nieren ausgeschieden (9). Ca. 95 % der Dosis sind nach 30 h aus dem Körper verschwunden (2). Wie der Mensch kann die Maus Methotrexat nicht enzymatisch abbauen (6). Sie scheidet das Mittel über die Nieren aus.

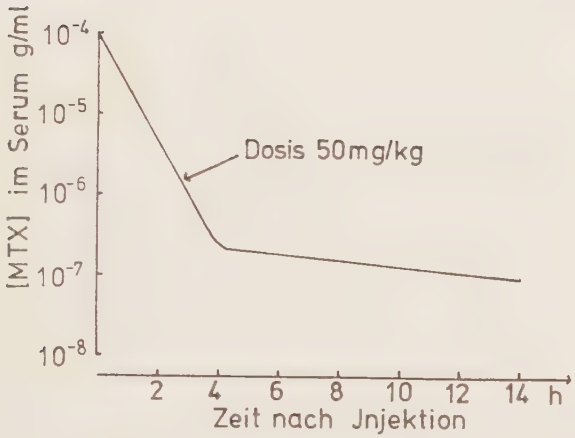


Abb. 24

Abb. 24 Serumkonzentration von Methotrexat in Abhängigkeit von der Zeit nach Injektion einer Dosis von 50 mg MTX/kg (nach Borsa et al (4)).

In einer Studie des N^5-Formyl-FH4 (Leucovorin)-Transports in L-1210-Zellen hemmte Methotrexat kompetitiv die Aufnahme dieser reduzierten Folsäure. Die Ausscheidung von Leucovorin wurde durch Methotrexat beschleunigt, während Folsäure wenig oder keinen Einfluß auf die Aufnahme oder die Ausscheidung von Methotrexat hatte (1).

Die Mechanismen der ansteigenden Arzneimittel (Methotrexat)-Resistenz sind in experimentellen Tumorsystemen beschrieben worden (1, 20).

- Ein Anstieg der Konzentration von Dihydrofolsäurereduktase während der Behandlung mit Methotrexat
- verminderter Transport in die Zelle
- veränderte Dihydrofolsäurereduktase mit abnehmender Affinität von Methotrexat

Alle bisherigen Überlegungen und Erkenntnisse über die Zellproliferation in einem Tumor, die in II. aufgeführten Proliferationsparameter vom Adenokarzinom und vom Fibrosarkom und dazu die Wirkungsweise von Methotrexat, müssen in die zusammenfassende Wertung der Versuchsergebnisse einbezogen werden.

3. Diskussion der Ergebnisse

Der Grund, warum Methotrexat bei einmaliger Gabe auch bei hoher Dosierung das Tumorwachstum nicht beeinflußte, lag wahrscheinlich darin, daß nur der Teil der Zellen, der sich gerade in der S-Phase befand, abgetötet oder im Wachstum behindert wurde. Dieser Anteil wäre für das Adenokarzinom etwa 12 - 13 % und für das Fibrosarkom etwa 23 %. Trotz dieses beim Fibrosarkom sehr hohen Anteils an S-Phasenzellen fand man bei keiner Einzeitbehandlung eine sichtbare Beeinflussung des Tumorwachstums (Abb. 1, 3, 5). Die Methode ist nicht empfindlich genug, um so geringe Effekte zu messen.

Wollte man mit Methotrexat wenigstens alle proliferierenden Zellen treffen (Adenokarzinom 25 %, Fibrosarkom 50 %), mußte das Agens während der gesamten Intermitoszeit (13,6 bzw. 15 h) abzüglich der S-Phasendauer einwirken. Deshalb wurde Methotrexat fraktioniert verabreicht. Die Behandlungsdauer konnte dabei durch die Zahl der Fraktionen und durch die Behandlungsintervalle variiert werden.

In einem Vergleich beim Fibrosarkom (III, 4, Abb. 10) wurde die Zahl der Fraktionen geändert, während die Gesamtdosis und die Behandlungsintervalle gleich blieben. Bei diesem Beispiel fiel die unterschiedliche Wirkung sehr deutlich aus. Die fünf Fraktionen beim 3 h-Intervall bewirkten, daß Methotrexat während des ganzen Zellzyklus

vorhanden war und somit jede Zelle, die sich in der S-Phase befand oder in diese überging, geschädigt wurde.

Das Tumorgewicht verringerte sich ab der Behandlung leicht, aber die Letalität betrug 100 %. Dagegen konnte Methotrexat bei den drei Fraktionen nicht alle Zellen, die zum Zeitpunkt der Erstbehandlung nicht in der S-Phase waren, erreichen, da die Summe der Nicht-S-Phasenzeit > 6 h ist. Somit wuchs der Tumor auch nach der Behandlung weiter - wenn auch langsamer - und sein Wachstum wurde nur um knapp 2 d verzögert.

Schon allein durch Veränderung der Behandlungsintervalle bei gleicher Dosis und Fraktionszahl wurde das Tumorwachstum unterschiedlich beeinträchtigt. Denn durch Verlängerung der Intervalle war Methotrexat länger am Wirkungsort, wobei aber die Methotrexat-Konzentration zwischen den Fraktionen mehr oder weniger stark schwankte.

In einem entsprechendem Versuch (III, 3) zeigte sich diese unterschiedliche Wirkung bei verschiedenen Intervallen. Recht instruktiv war der Vergleich beim Fibrosarkom (Abb. 8). Bei der Gabe im 1 h-Intervall verlangsamte sich das Tumorwachstum und war um etwa 4 d verzögert. Beim 6 h-Intervall wirkte das Agens Methotrexat um ein vielfaches länger ein, etwa während des ganzen Zellzyklus, so daß alle proliferierenden Zellen Methotrexat ausgesetzt waren. Der Effekt auf den Tumor wurde zwar deutlicher als beim 1 h-Intervall, aber keineswegs auch um ein vielfaches stärker. Der Tumor wurde nach der Behandlung kleiner und sein Wachstum verzögerte sich um etwa 5,5 - 6 d, also um 1,5 - 2 d länger als beim 1 h-Intervall. Nicht so klar wurden die Zusammenhänge beim Adenokarzinom (Abb. 7). Die Kurvenverläufe zwischen 1 h- und 6 h-Invervall unterscheiden sich kaum, wahrscheinlich auch deshalb, weil die Letalität mit 100 % bzw. 7/10 sehr hoch war. Daß die Wirkung auch bei den 1 h-Intervallen für beide Tumoren dennoch relativ groß war, kann wohl auf die starke Kummulation von Methotrexat zurückgeführt werden. Denn durch die hohe Dosis und das kurze Behandlungsintervall wurde eine hohe Methotrexat-Konzentration erreicht, die

dann entsprechend langsamer abflutete, so daß man eine längere Wirkungszeit annehmen mußte als der Behandlungsdauer entsprach. Für den insgesamt besseren Effekt auf das Fibrosarkom könnte dessen hohe Wachstumsfraktion von 50 % mitverantwortlich sein. Alle anderen Proliferationsparameter vom Fibrosarkom und vom Adenokarzinom unterscheiden sich nur geringfügig und sind für eine Interpretation der Ergebnisse ohne Bedeutung.

In einem anderen Vergleich beim Fibrosarkom (III, 4. Abb. 10) unterschieden sich die zwei Durchschnittskurven ebenfalls sehr deutlich. Das lange Fraktionierungsintervall von 12 h hatte zur Folge, daß das Tumorwachstum bis zum Tod der Mäuse 2 - 3 d nach Behandlungsbeginn praktisch stillstand, während beim 3 h-Intervall eine kaum nennenswerte Verzögerung von 1,5 d zu verzeichnen war.

Wenn man davon ausgeht, daß es eine selbstbegrenzende Wirkung von Methotrexat nicht gibt (8), dann dient die Fraktionierung der Dosis und die Wahl der Behandlungsintervalle dem Ziel, eine genügend hohe Konzentration über eine längere Dauer am Wirkungsort aufrechtzuerhalten. Dadurch sollten alle proliferierenden Zellen, die Methotrexat in der S-Phase ausgesetzt sind, inaktiviert werden. In diesem Fall müßten beim Adenokarzinom 25 % und beim Fibrosarkom 50 % der Zellen abgetötet werden. Zudem könnten im Intervall ruhende Go-Zellen rekrutiert werden und wären dann der Behandlung zugänglich. Im optimalen Fall, bei einer Wachstumsverzögerung von 5 - 6 d wurde die Erwartung weit übertroffen, da wesentlich mehr als 50 % der Zellen inaktiviert wurden. In anderen Fällen, in denen die Therapie ebenfalls über die ganze Intermitosezeit ausgedehnt wurde, die Wirkung auf den Tumor aber deutlich schwächer ausfiel, stellte sich die Frage, ob Methotrexat bei fraktionierter Gabe am Wirkungsort auch eine genügend hohe Konzentration erreichte und diese im Intervall behielt.

In unseren Versuchen jedenfalls hat sich herausgestellt, daß bei gleicher Zahl von Fraktionen und gleichem Behandlungsintervall die Höhe der Dosis in der Tumortherapie ebenfalls

eine Rolle spielt, wie die folgenden Beispiele zeigen. Dazu seien die gemittelten Tumorwachstumskurven für das Adenokarzinom aufgeführt (III, 5, Abb. 11).

Die Verdoppelung der Dosis (5 x 10 mg MTX/kg und 5 x 20 mg MTX/kg, Intervall 3 h) führte hier nur zu einer geringen Wirkungszunahme, die sich im veränderten Kurvenverlauf ausdrückte. Die Letalität stieg dagegen stark an von 0 auf 7/10. Sehr viel anschaulicher stellte sich der Sachverhalt für das Fibrosarkom dar, bei dem die Dosis verdreifacht wurde (Vergleiche III. 4. Abb. 10 mit III. 5. Abb. 13). Einer Wachstumsverzögerung von etwa 2 d bei einer Dosis von 5 x 10 mg MTX/kg, Intervall 3 h stand ein Wachstumsstillstand des Tumors von 4 - 7 d bis zum Tod der Mäuse gegenüber und die Letalität stieg von 1/10 auf 100 % bei der Dosis von 5 x 30 mg MTX/kg, Intervall 3 h. Das Tumorgewicht verringerte sich bei der hohen Dosis ab Behandlungsbeginn.

Die bisherigen Ausführungen haben bewiesen, daß bei einer optimalen Tumortherapie Behandlungsdauer und Dosis aufeinander abgestimmt sein müssen. Um überhaupt einen deutlichen Effekt erzielen zu können, muß die Therapie über die ganze Intermitosezeit ausgedehnt werden, die einer Schwelle für den Behandlungserfolg entspricht. Dabei muß aber auch die Dosis eine gewisse Schwelle überschreiten, wofür die beiden letzten Vergleiche einen Hinweis geben. Freilich wird die Tumorbehandlung durch die hohe Toxizität stark beeinträchtigt.

Bei weiterer Ausdehnung der Behandlungsdauer über mehrere Tage fand sich keine entsprechende Verbesserung des Effekts mehr. Die Ergebnisse eines Versuchs beim Adenokarzinom (III. 6. Abb. 15) zeigten zwar, daß mit jeder Fraktion im 24 h-Intervall die Effektivität zunahm, die Letalität aber gleichzeitig stärker anstieg (Abb. 18). Die Wachstumsverzögerung erreichte bei fünf Fraktionen im 24 h-Intervall bei einer Gesamtdosis von 500 mg MTX/kg einen Wert von 5 - 6 d. Dieser von allen unserer Versuche höchste Wert wurde aber auch schon bei einer wesentlich kürzeren Behandlungsdauer und zwar bei drei Fraktionen im 6 h-Intervall

mit der geringeren Dosis von 300 mg MTX/kg beim Fibrosarkom (III. 3.) erreicht.

Eine intensive kurzzeitige Therapie, die sich über die gesamte Intermitosezeit erstrecken mußte, hatte zur Folge, daß sich das Tumorwachstum erst 5 - 6 d nach der Behandlung normalisierte, während bei der extensiven Langzeitbehandlung schon 2 d nach der letzten Fraktion der normale Wachstumsverlauf wieder hergestellt war. Die Methotrexat-Konzentration ist im 24 h-Intervall wohl so weit abgefallen, daß mit jeder Fraktion immer nur die S-Phasenzellen getroffen wurden, während die anderen Intermitosezellen im langen Intervall das normale Proliferationsmuster wiederherstellen konnten, oder ruhende Go-Zellen an Stelle von abgetöteten S-Phasenzellen die Proliferation aufnahmen.

4. Experimente mit Methotrexat auf Mäusetumoren aus der Literatur - Vergleich mit eigenen Ergebnissen

Unsere Ergebnisse sollen im folgenden mit in vivo-Experimenten aus der Literatur verglichen werden. Dabei ist zu beachten, daß die Versuche unterschiedlich durchgeführt und ausgewertet wurden.

Wie unterschiedlich Methotrexat auf das KHT-Fibrosarkom (13, 14) und das AKR-Lymphom (5, 14) der Maus wirkt, zeigen folgende Diagramme (Abb. 25 und 26).

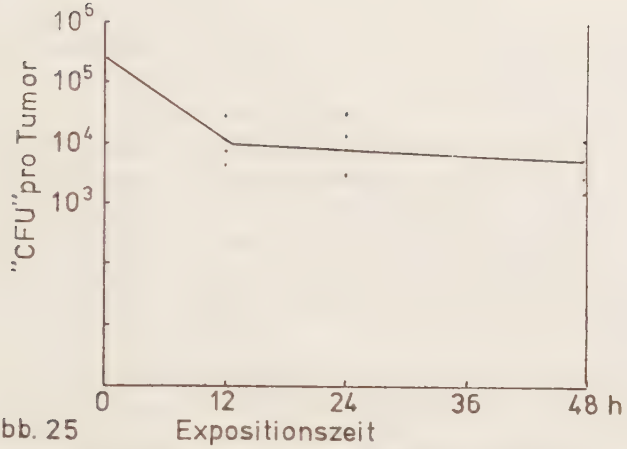


Abb. 25

Abb. 25 Zeitüberlebenskurve für KHT-Fibrosarkom
CFU = Colony forming units (nach Lin and Bruce 1972 (13))

0,5 mg MTX pro Maus wurden intravenös alle 4 h gegeben. 4 h nach der letzten Injektion wurden die Tumoren als Zellsuspension präpariert und in der Gewebekultur die Zahl der kolonienbildenden Zellen bestimmt.

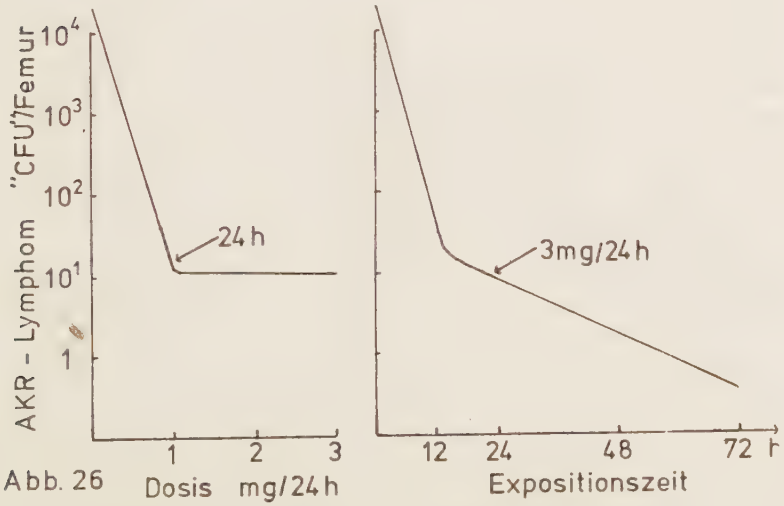


Abb. 26

Abb. 26 AKR-Lymphom, Überlebensfraktion nach 24 h Exposition bei verschiedener Dosis (nach Bruce et al (5))

Zeitüberlebenskurve bei einer Dosis von 3 mg/24 h

Das Mittel wurde ebenfalls alle 4 h gegeben, d.h. bei 3 mg/24 alle 4 h 0,5 mg MTX pro Maus. Ausgewertet wurden dabei die CFU in Femur.

Die Überlebenskurve für die Sarkomzellen endet schon bald in einem Plateau bei einer Überlebensrate von etwa 5 %, während nur eine minimale Zahl von Lymphomzellen (< 0,1 %) überlebt. Das könnte daran liegen, daß die Lymphomzellen schneller wachsen und die Wachstumsfraktion größer ist als beim Sarkom, also ideale Voraussetzungen für Methotrexat bieten (10, 15, 20).

Der biphasische Verlauf für beide Tumortypen weist auf die Existenz einer Subpopulation von sehr langsam proliferierenden Zellen hin (12, 20). Ein direkter Vergleich mit den eigenen Ergebnissen kann nicht aufgestellt werden, weil die Untersuchungsmethoden zu verschieden sind. Trotzdem kann man folgendes festhalten. Wie in unseren Versuchen wirkt Methotrexat nur bei fraktionierter Gabe und umso besser, je länger es einwirkt.

Shewell (1976) (19), der sich mit dem Effekt von Methotrexat beim spontanen Mammakarzinom der weiblichen C3H-Maus befaßte, kam zu folgendem Ergebnis: Durch einmalige Injektion von Methotrexat direkt in den Tumor erreichte er bei Steigerung der Dosis auch einen besseren Antitumoreffekt. Bei intratumoraler Gabe von 80 mg MTX/kg, gefolgt von Leucovorin nach 24 h, betrug die Wachstumsverzögerung fast 10 d. Die Ansprechbarkeit des Tumors wurde allerdings durch Leucovorin reduziert. Durch die intramurale Gabe des Mittels wird die Pharmakokinetik unübersichtlich, so daß dieses Ergebnis mit den unseren ebenfalls nicht direkt vergleichbar ist.

V. ZUSAMMENFASSUNG

- Das Fibrosarkom und das Adenokarzinom sprechen auf Methotrexat ohne auffallenden Unterschied an.
- Methotrexat wirkt nur bei fraktionierter Gabe auf den Tumor. Dabei wird der Antitumoreffekt mit zunehmender Einwirkungsdauer von Methotrexat verbessert. Die Behandlung muß mindestens auf die ganze Intermitosezeit ausgedehnt sein, um eine Wachstumsverzögerung von mehreren Tagen erzielen zu können.
- Der Behandlungserfolg hängt dabei auch von der Höhe der Dosis, aber wesentlich weniger als von der Behandlungsdauer ab.
- Die längste Tumorwachstumsverzögerung weisen folgende Versuchsgruppen mit je 5 - 6 d auf
  Fibrosarkom: 3 x 100 mg MTX/kg, Intervall 6 h (Letalität 4/10)
  Adenokarzinom: 5 x 100 mg MTX + je 10 mg L/kg, Intervall 24 h (Letalität 5/6)

LITERATURVERZEICHNIS

1. BERTINO, J.R.: Folate antagonists, A.C. SARTORELLI, D.G. JOHNS: Antineoplastic and immunosuppressive agents. Part II, Chapter 52, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1975)

2. BLEYER, W. Archie: The clinical pharmacology of methotrexate. Cancer 41, 36-51 (1978)

3. BROSA, J., G.F. WHITMORE: Cell-killing studies on the mode of action of methotrexate (MTX) on L-cells in vitro. Cancer Res. 29, 737-744 (1969)

4. BORSA, J., G.F. WHITMORE, F.A. VALERIOTE, D. COLLINS, W.R. BRUCE: Studies on the persistance of methotrexate, cytosine arabinoside, and leucovorin in serum of mice. J. Nat. Cancer Inst. 42, 235-242 (1969)

5. BRUCE, W.R., W.E. POWERS, F.A. VALERIOTE: Comparison of the dose- and time-survival curves for normal hematopoietic and lymphoma colony-forming cells exposed to vinblastine, vincristine, arabinosyl cytosine and amethopterin. J. Nat. Cancer Inst. 42, 1015-23 (1969)

6. CHABNER, B.A., D.G. JOHNS, J.R. BERTINO: Enzymatic cleavage of methotrexate provides a method for prevention of drug toxicity. Nature 239, 395-397 (1972)

7. COHEN, S.: On the nature of thymineless death. Ann. N.Y. Acad. Sci. 186, 292-301 (1971)

8. EICHHOLTZ, H., K.R. TROTT: Methotrexate: The effect of drug concentration and exposure time on mammalian cell survival in vitro. Brit. J. Cancer 41, 277-284 (1980)

9. HENDERSON, E.S., R.H. ADAMSON, V.T. OLIVERO: The metabolic fate of tritiated methotrexate. II. Absorption and excretion in man. Cancer Res. 25, 1018-1024 (1965)

10. HRYNIUK, W.M.: Purineless death as a link between growth rate and cytotoxicity by methotrexate. Cancer Res. 32, 1506-1511 (1972)

11. KUMMERMEHR, J., K.-R. TROTT: Sensitization of a transplantable murine fibrosarkoma by partial synchronization with hydroxyurea. Radiobiological Research and Radiotherapy I.A.E.A. Vienna, Austria (1977)

12. LAMERTON, L.F.: Cell proliferation and the differential response of normal and malignant tissues. Br. J. Radiol. 45, 161-170 (1972)

13. LIN, H., W.R. BRUCE: Chemotherapy of the transplanted KHT fibrosarkoma in mice. Ser. Haemat. V, 89-104 (1972)

14. LIN, H., W.R. BRUCE: Effect of amethopterin on cells of experimental tumors. Ann. N.Y. Acad. Sci. 186, 325-329 (1971)

15. PUTTEN, L. van: Are cell kinetic data relevant for the design of tumour chemotherapy schedules? Cell Tissue Kinet. 7, 493-504 (1974)

16. RAJEWSKY, M.F.: Proliferative properties of malignant cell systems. Im Handbuch der Allgemeinen Pathologie, Band VI/5 Springer-Verlag, Berlin (1974)

17. RUF, J.: Der Einfluß des Zeitfaktors auf die Toxizität von Methotrexat in C3H-Mäusen. Diss. Med. Fak. München, in Vorbereitung

18. SZCZEPANSKI, L.v., K.-R. TROTT: Post-irradiation proliferation kinetics of a serially transplanted murine adenocarcinoma. Brit. J. Radiol. 48, 200-208 (1975)

19. SHEWELL, J.: The effect of MTX on spontaneous mammary adenocarcinoma in female C3H-mice. Brit. J. Cancer, 33, 210-216 (1976)

20. STEEL, G.G.: Growth kinetics of tumours. Cell population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer. Clarendon Press, Oxford (1977)

21. WERKHEISER, W.C.: Mathematical simulation in chemotherapy. Ann. N.Y. Acad. Sci. 186, 343-358 (1971)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MTX	Methotrexat
L	Leucovorin
DHFR	Dihydrofolsäurereduktase
DNA	Desoxyribonucleinsäure
RNA	Ribonucleinsäure
CFU	Colony Forming Units
AK	Adenokarzinom
FS	Fibrosarkom
S.E.	Standard Error

LEBENSLAUF

Am 23.10.1951 wurde ich, Heinrich Gruber, in Passau als fünftes Kind meiner Eltern, Max und Anna Gruber, geboren. In meinem Heimatort Dorfbach besuchte ich von 1958 bis 1962 die Volksschule und trat nach der 4. Klasse auf das Humanistische Gymnasium Fürstenzell über. Nach meinem Abitur im Juni 1971 leistete ich vom Juli 1971 bis Juni 1973 als Soldat Dienst bei der Bundeswehr. Im Wintersemester 1973/74 nahm ich in den Fächern Physik und Chemie das Studium an der Universität München auf. Seit dem Sommersemester 1975 studierte ich Humanmedizin und beendete mein Studium am 20. November 1980 mit dem Staatsexamen.

München, 8.1.1981